

**Herstellung und Evaluierung eines Modellsystems zur *in vivo* Untersuchung der
humanen DNA Fehlpaarungsreparatur (*mismatch repair* - MMR)**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Annika M. Siebert
aus Meppen

1. Referent:	Professor Dr. Jürgen Wehland
2. Referent:	Professor Dr. Norbert F. Käufer
eingereicht am:	13.02.2008
mündliche Prüfung (Disputation) am:	08.05.2008

Druckjahr 2008

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge

Dirks W.G., Siebert A.M., Fähnrich S., Boege G., Drexler H.G., Mielke C.: Regulation Properties of Human Mismatch Repair Activity. Poster. First German-French DNA Repair Meeting, Toulouse, Frankreich (15.09.-19.09.2007).

Siebert A.M., Mielke C., Fähnrich S., Merkhoffer Y., Drexler H.G., Dirks W.G.: High Frequency of Microsatellite Instability (MSI) in Lymphoid Tumour Cell Lines. Poster 0167. 12th Congress of the European Hematology Association, Wien, Österreich (07.06.-10.06.2007).

Inhaltsverzeichnis

Vorveröffentlichungen der Dissertation	I
Inhaltsverzeichnis	II
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1. Einleitung	1
1.1. DNA Reparatur.....	1
1.2. Besonderheiten der MMR	6
1.2.1. MMR Proteine	6
1.2.2. Struktur der Proteine MSH2, MSH3 und MSH6.....	7
1.2.3. Strangdiskriminierung	8
1.2.4. Fehlererkennung und Einleitung des MMR Prozesses.....	9
1.2.5. Bidirektionale Reparatur.....	10
1.2.6. Zellzykluskontrolle und Apoptose	11
1.2.7. Weitere Prozesse, an denen MMR beteiligt ist.....	12
1.2.8. Neuere Bedeutung der MMR	13
1.3. Mikrosatelliten Instabilität (MSI).....	14
1.4. HNPCC	15
1.5. Spleißen	17
1.6. Zielsetzung	19
2. Material und Methoden	21
2.1. Materialien.....	21
2.1.1. Chemikalien, Enzyme und Kits	21
2.1.2. Verbrauchsmaterialien und Glasware.....	23
2.1.3. Geräte	23
2.1.4. Plasmide	25
2.2. Bakterienkultur	25
2.2.1. Bakterienstämme	25
2.2.2. Kulturmedien	25

2.2.3. Stammhaltung und Kultivierung	26
2.2.4. Herstellung elektrokompenter <i>E. coli</i> Bakterien (Stamm XL-1 Blue)	26
2.2.5. Transformation mittels Elektroporation	27
2.2.6. Plasmidisolierung	27
2.2.6.1. Analytische Plasmidisolierung („Klare Lysate“)	27
2.2.6.2. Plasmidisolierung im großen Maßstab („Maxi-Präp“)	28
2.2.7. Restriktionsverdaus	29
2.2.8. Isolierung von DNA Fragmenten aus einem TAE-Agarose-Gel	29
2.2.9. Klonierung	30
2.3. Zellkultur	30
2.3.1. Kulturmedien und Lösungen	30
2.3.2. Zelllinien	31
2.3.3. Kulturbedingungen	33
2.3.4. Passagieren von Monolayerkulturen	33
2.3.5. Passagieren von Suspensionskulturen	34
2.3.6. Einfrieren und Auftauen der Zellen	34
2.3.7. Bestimmung von Zellzahl und Viabilität	34
2.3.8. Stabile Transfektion humaner Zelllinien	35
2.3.9. Zellzyklussynchronisation	36
2.3.10. Fluoreszenzaktivierte Zellanalyse (<i>fluorescence activated cell sorting</i> - FACS)	37
2.4. Biochemische Methoden	38
2.4.1. DNA-Isolierung aus humanen Zellen	38
2.4.2. RNA-Isolierung aus humanen Zellen	38
2.4.3. Überprüfung der Quantität und Qualität von isolierten Nukleinsäuren	39
2.4.4. cDNA-Synthese	39
2.4.5. Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i> - PCR)	40
2.4.6. Agarose-Gelelektrophorese	43
2.4.7. Kapillarelektrophorese	44
2.4.8. Sequenzierung von cDNAs	44
2.4.9. Bisulfit Konversion und <i>methylation-specific PCR</i> (MSP)	45
2.4.10 Real-Time-PCR	46

2.5. Immunologische Methoden	48
2.5.1. Antikörper.....	48
2.5.2. Quantifizierung von Proteinen nach Bradford.....	49
2.5.3. Western Blot.....	49
2.5.4. 2D-Gelelektrophorese.....	52
2.5.5. Co-Immunpräzipitation	54
2.6. <i>Live-cell imaging</i>	56
2.6.1. Epifluoreszenzmikroskopie	56
2.6.2. Konfokale Mikroskopie.....	57
2.6.3. FRET Analysen	57
3. Ergebnisse.....	58
3.1. Ursachen für MSI in humanen Zelllinien aus Tumoren verschiedener Gewebe.....	58
3.1.1. MMR Proteine in MSI Zelllinien	59
3.1.2. Untersuchung der MSH Transkripte in MSI Zelllinien.....	61
3.1.2.1. MSH Transkripte in MSI Zelllinien	61
3.1.2.2. Polymorphismus des MSH3 Gens.....	64
3.1.3. MLH1 Promotormethylierung in MSI Zelllinien	66
3.1.4. Zusammenfassung der Untersuchungen zu den Ursachen für MSI in Zelllinien...	67
3.2. Alternative Transkripte für MSH2, MSH3 und MSH6 in MMR profizienten Zellen...	68
3.2.1. Nachweis von Transkriptvarianten für MSH2, MSH3 und MSH6	68
3.2.2. Authentizität der Sequenzen.....	70
3.2.3. Proteinisoformen für MSH2, MSH3 und MSH6.....	72
3.2.4. Übersicht über die alternativen MSH Transkripte in MMR profizienten Zellen ...	74
3.3. Expression rekombinanter MSH Proteine	75
3.3.1 Klonierungsstrategie.....	75
3.3.2. Expressionsvektoren.....	76
3.3.3. Stabile Expression der fluoreszenzmarkierten MSH Proteine	79
3.3.3.1. Transfektion und Etablierung von Einzelklonen	80
3.3.3.2. Beeinflussung der Expression endogener MSH Proteine.....	81
3.3.4. Protein-Protein-Interaktionen	82
3.3.4.1. Co-Immunpräzipitationen.....	82

3.3.4.2. FRET Analysen	85
3.3.5. Lokalisation	86
3.3.6. Co-Lokalisation von MSH Proteinen und PCNA nach UVA Bestrahlung	89
3.3.6.1. Akkumulation von MSH Proteinen an UVA induzierten DNA Schäden	90
3.3.6.2. Kinetik der Akkumulation von MSH Proteinen und PCNA	90
3.3.6.3. Zusammenfassung des UVA Experiments	92
3.3.7. Übersicht über die Expression rekombinanter MSH Proteine	92
3.4. Zellzyklusabhängige Regulation von MMR	93
3.4.1. Regulation der MSH Proteine	94
3.4.2. Regulation auf transkriptioneller Ebene	96
3.4.3. Übersicht über die Regulation von MSH2, MSH3 und MSH6	98
4. Diskussion	99
4.1. MSI in humanen Tumorzelllinien.....	99
4.1.1. Ursachen für MSI in humanen Tumorzelllinien.....	99
4.1.2. MSH3 Polymorphismus	100
4.2. Stabilisierung der Bindungspartner MSH3 und MSH6 durch MSH2	101
4.3. Alternative Transkripte für MSH2, MSH3 und MSH6	102
4.4. Proteinisoformen für MSH2, MSH3 und MSH6.....	105
4.5. MSH Proteine exprimierende Einzelklone als Werkzeuge für MMR Studien.....	107
4.6. Bildung der Heterodimere MutS α und MutS β	109
4.7. Lokalisation der Proteine MSH2, MSH3 und MSH6 sowie ihrer Varianten	111
4.8. Co-Lokalisation von MSH Proteinen mit PCNA an UVA geschädigter DNA.....	113
4.8.1. MSH Wildtypproteine co-lokalisieren mit PCNA.....	113
4.8.2. MSH Proteinvarianten co-lokalisieren nicht mit PCNA	114
4.8.3. Übersicht über das UVA Experiment.....	115
4.9. Eigenschaften und Funktionen der alternativen Proteine	116
4.10. Zellzyklusabhängige Regulation von MSH2, MSH3 und MSH6	119
4.11. Abschließende Betrachtung.....	121
5. Zusammenfassung	123
6. Literaturverzeichnis.....	124
Danksagungen	134

Lebenslauf	135
------------------	-----

Abbildungsverzeichnis

1.1: Übersicht über die Fehlpaarungsreparatur (<i>mismatch repair</i> – MMR).....	5
1.2: Struktur der MSH Proteine.....	8
1.3: Fehlererkennung durch MutS α nach dem Modell der betenden Hände von Jiricny (2000).....	10
1.4: Für den Spleißprozess wichtige Sequenzen der Prä-mRNA	18
3.1: Expressionsmuster der Proteine MSH2, MSH3 und MSH6	60
3.2: Strategie zur Untersuchung der MSH Transkripte mittels RT-PCRs.....	61
3.3: Nachweis der MSH Transkripte	63
3.4: Polymorphismus des MSH3 Gens.....	65
3.5: Der MLH1 Promotor ist in nur einer der untersuchten Zelllinien methyliert	66
3.6: Transkripte für MSH2, MSH3 und MSH6	70
3.7: Detektion von Doppelbanden mit dem MSH3 spezifischen Antikörper.....	72
3.8: Endogene Proteinisoformen für MSH2 und MSH6	74
3.9: Amplifikation des MSH2 Transkripts	76
3.10: Verwendete Expressionsvektoren.	77
3.11: Einfluss der rekombinanten Proteine auf die Expression der endogenen Proteine	81
3.12: Heterodimerbildung von rekombinanten mit endogenen MSH Proteinen	84
3.13: Intrazelluläre Lokalisation der MSH2, MSH3 und MSH6 Wildtypproteine und ihrer Varianten.....	87
3.14: Co-Lokalisation der MSH2, MSH3 und MSH6 Wildtypproteine mit PCNA an UVA induzierten DNA Schäden.....	91
3.15: Überprüfung der Zellzyklussynchronisation mittels FACS Analyse	94
3.16: Regulation der endogenen MSH Proteine im Verlauf des Zellzyklus	95
3.17: Regulation der Transkripte MSH2-WT und MSH-V1 im Verlauf des Zellzyklus	97

Tabellenverzeichnis

2.1: Übersicht über die verwendeten Chemikalien, Enzyme und Kits.....	21
2.2: Übersicht über die Verbrauchsmaterialien und Glasware	23
2.3: Übersicht über die Geräte.....	23
2.4: Übersicht über die Zellkulturmedien.....	31
2.5: Übersicht über die Zelllinien.....	32
2.6: Übersicht über die im Rahmen der RT-PCRs verwendeten Primer	42
2.7: Übersicht über die im Rahmen der Untersuchung des MSH3 Polymorphismus verwendeten Primer	43
2.8: Übersicht über die Sequenzierungsprimer.....	45
2.9: Übersicht über die zur Durchführung der MSP verwendeten Primer	46
2.10: Übersicht über die für die Real-Time-PCR verwendeten Primer und Sonden.....	48
2.11: Übersicht über die Antikörper	49
2.12: Molekulare Größen der für die vorliegende Arbeit relevanten Proteine.....	51
2.13: Übersicht über die Absorptions- und Emissionsmaxima von CFP, GFP und YFP	56
3.1: Übersicht über die 41 untersuchten MSI Zelllinien	59
3.2: Übersicht über die von den MSI Zelllinien gewonnenen Daten	67
3.3: Übersicht über die Basenaustausche in den für die Klonierungen verwendeten cDNAs.....	71
3.4: Übersicht über die Vektoren zur stabilen Expression der MSH Proteine	79

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Adenin
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AID	aktivierungsinduzierte Cytidin-Deaminase
Ala	Alanin
APC	Aphidicolin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BER	Basen-Excisionsreparatur
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
CALS	Café-au-Lait-Flecken (<i>café-au-lait spots</i>)
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
CFP	cyan fluoreszierendes Protein (<i>cyan fluorescent protein</i>)
CMV	Cytomegalievirus
Co-IP Puffer	Co-Immunpräzipitationspuffer
CPD	Cyclobutan Pyrimidin Dimer
DMSO	Dimethyl Sulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DSB	Doppelstrangbruch
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EASI	<i>enrichment of alternatively spliced isoforms</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	verbessertes grün fluoreszierendes Protein (<i>enhanced green fluorescent protein</i>)
ESE	Exon-Spleißverstärker (<i>exonic splicing enhancer</i>)
ESS	Exon-Spleißrepressor (<i>exonic splicing silencer</i>)
Exo1	Exonuklease 1
FACS	Fluoreszenzaktivierte Zellanalyse (<i>fluorescence activated cell sorting</i>)
FBS	Fötales Rinderserum (<i>fetal bovine serum</i>)
FRET	Fluoreszenz-Resonanzenergie-Transfer
g	Gramm
G	Guanin
GFP	grün fluoreszierendes Protein (<i>green fluorescent protein</i>)
GGR	transkriptionsunabhängige Reparatur (<i>global genome repair</i>)
Glu	Glutamat
h	Stunde

HNPCC	hereditäres nichtpolypöses kolorektales Karzinom (<i>hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma</i>)
HR	Homologe Rekombination
HypoP	Hypotonischer Puffer
IDL	Insertions-/ Deletionsschleife (<i>insertion/ deletion loop</i>)
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IEP	Isoelektrischer Punkt
IPG	Immobilisierter pH-Gradient
IPTG	Isopropyl-1-thio- β -D-galactosid
IRES	<i>internal ribosomal entry site</i>
ISE	Intron-Spleißverstärker (<i>intronic splicing enhancer</i>)
ISS	Intron-Spleißrepressor (<i>intronic splicing silencer</i>)
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	<i>luria broth</i>
Lsg.	Lösung
M	Molarität/ Stoffmengenkonzentration
m	Meter
mA	Milliampere
MEF	<i>mouse embryonic fibroblast</i>
MGMT	O ⁶ -Methylguanin Methyltransferase
min	Minute
MLH	MutL Homolog
MMR	Fehlpaarungsreparatur (<i>mismatch repair</i>)
MNNG	N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
MSH	MutS Homolog
MSI	Mikrosatelliten Instabilität
MSP	<i>methylation-specific PCR</i>
MSS	Mikrosatelliten Stabilität
NA	Numerische Apertur
NEAS	nichtessentielle Aminosäuren
NER	Nukleotid-Excisionsreparatur
NES	Kernexportsignal (<i>nuclear export signal</i>)
NHEJ	Verbindung nicht homologer Enden (<i>nonhomologous ends joining</i>)
NLS	Zellkern-Lokalisationssignal (<i>nuclear localization signal</i>)
OD	Optische Dichte
PAC	Puromycin N-Acetyltransferase
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
Phe	Phenylalanin
PIC	<i>protease inhibitor cocktail</i>

PIP	Phosphataseinhibitorpuffer
PIP-Box	PCNA Bindemotiv (<i>PCNA interacting protein</i>)
PMS	<i>post-meiotic segregation protein</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pol	Polymerase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RFC	<i>replication factor C</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>)
RPA	<i>replication protein A</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
sec	Sekunden
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
snRNP	<i>small nuclear ribonucleoprotein</i>
SSA	<i>single-strand annealing</i>
SSB	Einzelstrang-DNA-bindendes Protein (<i>single-stranded DNA binding protein</i>)
T	Thymin
<i>T. aquaticus</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TB	<i>terrific broth</i>
TBP	<i>TATA-box binding protein</i>
TCR	Transkriptionsgekoppelte Reparatur (<i>transcription coupled repair</i>)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
TGFβRII	Klasse II Rezeptor des Tumorwachstumsfaktors β (<i>type II TGFβ receptor</i>)
TLS	Translasionssynthese
U	Uracil
u	<i>unit</i>
UNG	Uracil-DNA Glycosylase
UV	Ultraviolett
UVA	Ultraviolett A
UVB	Ultraviolett B
V	Volt
V1, V2 etc.	Variante 1, Variante 2 etc.
vgl.	vergleiche
WT	Wildtyp
XP	Xeroderma pigmentosum
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-β-D-galactosid
Y	Pyrimidin (C oder T)
YFP	gelb fluoreszierendes Protein (<i>yellow fluorescent protein</i>)

Präfixe und Symbole

k	kilo
c	zenti
m	milli
μ	mikro
n	nano
α	alpha
β	beta
γ	gamma
δ	delta
Δ	Delta
ε	epsilon
η	eta
ζ	zeta
∞	unendlich

1. Einleitung

1.1. DNA Reparatur

Sämtliche Informationen, die zur Ausprägung der Merkmale eines Organismus bzw. Individuums benötigt werden, sind in Form von DNA gespeichert. Der Erhalt dieser Informationen ist jedoch durch das Auftreten von DNA Schäden einerseits und Replikationsfehlern andererseits gefährdet. Schäden entstehen aufgrund exogener Faktoren, wie UV Strahlung, aber auch aufgrund endogener Faktoren, wie reaktiven Sauerstoffspezies, die aus der Zellatmung hervorgehen. Bei einem DNA Schaden werden fremde Molekülgruppen angehängt, anormale kovalente Bindungen eingegangen oder bestehende Bindungen zerstört. Anders verhält es sich mit Fehlern, die während der Replikation entstehen. Beide DNA Einzelstränge sind für sich genommen völlig intakt. Allerdings sind die beiden Einzelstränge durch den fehlerhaften Einbau von Basen bei der DNA Neusynthese nicht vollkommen komplementär, so dass in der Doppelhelix Fehlpaarungen oder Insertions- bzw. Deletionsschleifen gebildet werden. Da sowohl DNA Schäden als auch Replikationsfehler zu Mutationen führen können, die Erkrankungen wie Krebs auslösen, müssen sie entfernt werden. Es gibt diverse Reparaturwege, die auf die Beseitigung unterschiedlicher DNA Schäden spezialisiert sind. So werden Schäden an einzelnen Basen über die direkte Reparatur, die Basen-Excisionsreparatur (BER) oder die Nukleotid-Excisionsreparatur (NER) behoben. Doppelstrangbrüche hingegen werden über die Homologe Rekombination (HR), das sogenannte *single-strand annealing* (SSA) oder die Verknüpfung nicht homologer Enden (*nonhomologous ends joining* - NHEJ) repariert. Auf die Entfernung von Replikationsfehlern ist nur ein System spezialisiert, nämlich die Fehlpaarungsreparatur (*mismatch repair* - MMR). Um einen Überblick über die Funktionen der genannten Reparaturwege zu geben, werden sie im Folgenden einzeln vorgestellt.

Direkte Reparatur

An der direkten Reparatur ist jeweils nur ein einziges Protein beteiligt, das den Schaden an der DNA sowohl erkennt als auch entfernt. Ein Beispiel stellt die O⁶-Methylguanin Methyltransferase (MGMT) dar. Sie erkennt Methylgruppen, die unter dem Einfluss

alkylierender Agenzien an das O⁶-Atom von Guaninen angehängt werden, und entfernt sie. Dabei wird die Methylgruppe auf einen Cysteinrest des Proteins übertragen. Da diese Bindung irreversibel ist, ist das Enzym anschließend dauerhaft inaktiviert und ist damit ein sogenanntes Selbstmord-Enzym (Harris et al. 1983).

Basen-Excisionsreparatur (BER)

Über BER können oxidierte, reduzierte, deaminierte oder alkylierte Basen entfernt werden. Oxidierte Basen treten zum Beispiel nach UV Bestrahlung auf, da diese unter anderem zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies führt (*reactive oxygen species* - ROS). Ein weiteres Substrat für BER sind abasische Stellen in der DNA, die durch eine spontane Hydrolyse oder oxidativen Basenverlust entstehen (Übersicht in Sancar et al. 2004). BER unterteilt sich in eine sogenannte *short-patch* und eine *long-patch* Reparatur. Der erste Schritt bei der *short-patch* Reparatur besteht in der Entfernung der veränderten Base und wird von einer Glycosylase durchgeführt. Danach werden der verbliebene Zucker und der Phosphatrest über APE1 und die Lyasefunktion der den Prozess einleitenden Glycosylase oder Polβ ausgeschnitten. Die anschließende Auffüllreaktion und Ligation wird von Polβ bzw. dem Ligase3/XRCC1 Komplex katalysiert. Die *long-patch* Reparatur findet in der Regel zur Entfernung abasischer Stellen in der DNA statt und beginnt mit einem Schnitt 5' von dieser Stelle, der von dem Enzym APE1 vermittelt wird. Ein Komplex aus Polδ/ε und PCNA entfernt ausgehend von dieser Schnittstelle 2-10 Nukleotide und füllt die entstehende Lücke wieder auf. Die entfernten Nukleotide bilden einen Einzelstrang, der zunächst noch an einem Ende mit dem Doppelstrang verbunden ist, dann aber von der Endonuklease FEN1 abgetrennt wird. Ligase1 schließt die *long-patch* Reparatur ab (Übersicht in Sancar et al. 2004).

Nukleotid-Excisionsreparatur (NER)

NER ist der wichtigste Mechanismus für die Entfernung von Nukleotiden, an die raumerfüllende Atomgruppen angehängt sind, die zu sterischer Hinderung führen. Auch werden über NER Nukleotide ausgetauscht, an die kleinere Atomgruppen gebunden sind. Darüber hinaus repariert NER UV induzierte Cyclobutan Pyrimidin Dimere (CPDs) und [6-4] Photoproducte (Übersicht in de Boer & Hoeijmakers 2000). Zudem konnte eine Beteiligung von NER Komponenten an der Reparatur von *interstrand cross-links* gezeigt werden (de Silva

et al. 2000). In Säugerzellen sind sechs aus insgesamt 15 Proteinen bestehende Reparaturfaktoren in die NER involviert, nämlich RPA, XPA, XPC, TFIIH, XPG und XPF·ERCC1. Die Schadenserkennung erfolgt über RPA, XPA und XPC. Diese rekrutieren TFIIH, woraufhin die DNA über eine Länge von etwa 20 bp entwunden wird. Nun bindet XPG, wobei XPC verdrängt wird. Sobald der Komplex XPF·ERCC1 hinzukommt, werden 5' und 3' von der geschädigten Base Einzelstrangbrüche initiiert und das daraus resultierende Oligomer von 24-32 Nukleotiden wird freigesetzt. Die Reparatursynthese erfolgt über PCNA und Polδ/ε und die Ligation über Ligase1. Bei NER unterscheidet man eine an die Transkription gekoppelte Reparatur (*transcription coupled repair* - TCR) und eine davon unabhängige Reparatur (*global genome repair* - GGR). Die TCR findet mit einer höheren Geschwindigkeit statt als die GGR und erfordert zwei zusätzliche Faktoren, nämlich CSA und CSB (Übersicht in Sancar et al. 2004). Defekte im NER System führen zu Xeroderma pigmentosum (XP), einer Erkrankung, die sich durch Überempfindlichkeit gegen UV Licht und erhöhtes Hautkrebsrisiko auszeichnet (Übersicht in de Boer & Hoeijmakers 2000). Diese Erkrankung kann außerdem auf einen Defekt der zur Translesionssynthese (TLS) befähigten Polymerase Polη zurückzuführen sein (Masutani et al. 1999).

Homologe Rekombination (HR)

Die HR ist auf die Reparatur von Doppelstrangbrüchen (DSBs) spezialisiert, wobei sie einen vollständigen oder fast vollständigen Erhalt der in Form von DNA gespeicherten Informationen gewährleistet. Dies ist möglich, indem jeweils ein Einzelstrang der beiden freien Enden in einen homologen DNA Strang eindringt und nach Entwindung der DNA an die nun einzelsträngig vorliegenden homologen Sequenzen bindet. Damit ist sichergestellt, dass die beiden Enden grundsätzlich zueinander passen. Über die sogenannte Schenkelwanderung (*branch migration*) erweitert sich der Abschnitt der Hybridisierung von zwei aus unterschiedlichen DNA Doppelsträngen stammenden Einzelsträngen. Wenn die bindenden Sequenzen nicht zu 100 % homolog sind, werden die resultierenden Basenfehlpaarungen korrigiert und ein Informationsverlust in Form von Genkonversion ist die Folge. Die eingedrungenen Einzelstrangenden werden gegebenenfalls verlängert. Es bildet sich eine Holliday-Struktur aus, mit deren Auflösung die Reparatur abgeschlossen wird. Vermutlich wird der DSB vom Mre11/Rad50/NBS1 (M/R/N) Komplex prozessiert, ehe die Bindung von

Rad51 die Strang-Invasion einleitet. Die Auflösung der Holliday-Struktur erfolgt über einen Komplex aus MUS81 und MMS4. Weitere an der HR beteiligte Proteine sind Rad52, Rad54, Rad55, Rad57, BRCA1 und BRCA2. Deren genaue Funktionen bei der HR sind noch ungeklärt (Übersicht in Sancar et al. 2004). Die HR findet vorrangig während der S-Phase statt (Saleh-Gohari & Helleday 2004).

Single-strand annealing (SSA)

Auch das SSA ist ein auf DSBs spezialisierter Reparaturprozess. Bei diesem Prozess werden über einen partiellen Verdau in 5'-3' Richtung so lange überhängende Enden generiert, bis diese komplementäre Sequenzen aufweisen und aufeinander binden können. Die nicht homologen Bereiche werden abgespalten. Bei diesem Reparaturprozess kommt es immer zu einem Informationsverlust, da Teile der DNA Stränge ersatzlos entfernt werden. Der Einzelstrangverdau, mit dem das SSA eingeleitet wird, erfolgt vermutlich in Abhängigkeit vom M/R/N Komplex. Wahrscheinlich sind auch RPA und Rad52 an dem SSA beteiligt (Übersicht in Sancar et al. 2004).

Verbindung nicht homologer Enden (*nonhomologous ends joining* - NHEJ)

Der dritte auf die Reparatur von DSBs spezialisierte Prozess ist die NHEJ. Diese wird mit der Bindung von einem aus Ku70 und Ku80 zusammengesetzten Heterodimer an den DSB eingeleitet, woraufhin die katalytische Untereinheit von DNA-PK rekrutiert wird. Anschließend ligiert der Ligase4·XRCC4 Komplex die Duplex-Enden ungeachtet dessen, ob sie zusammengehören oder nicht. Auch dieser Reparaturprozess kann daher zum Verlust von Informationen führen (Übersicht in Sancar et al. 2004). NHEJ findet im Gegensatz zur HR während des gesamten Zellzyklus statt, weshalb die Reparatur der meisten DSBs über diesen Weg erfolgt (Übersicht in Ma et al. 2005). Darüber hinaus ist NHEJ essentiell für das zur Variabilität von Antikörpern beitragende V(D)J Rearrangement (Übersicht in Sancar et al. 2004).

Fehlpaarungsreparatur (*mismatch repair* - MMR)

MMR ist der einzige Reparaturweg, der auf die Entfernung von Replikationsfehlern spezialisiert ist. Bei diesen Fehlern handelt es sich um Fehlpaarungen (*mismatches*), bei denen sich zwei nicht komplementäre Basen gegenüberstehen, oder um sogenannte Insertions-/

Deletionsschleifen (*insertion/ deletion loops* - IDLs), die sich ausbilden, wenn einer der beiden DNA Einzelstränge mehr Nukleotide enthält als der andere. Vom Ablauf her hat die MMR Ähnlichkeit mit BER und NER, da das fehlgepaarte Nukleotid nach seiner Erkennung ausgeschnitten und die dabei entstehende Lücke anschließend wieder aufgefüllt wird (Abb. 1.1).

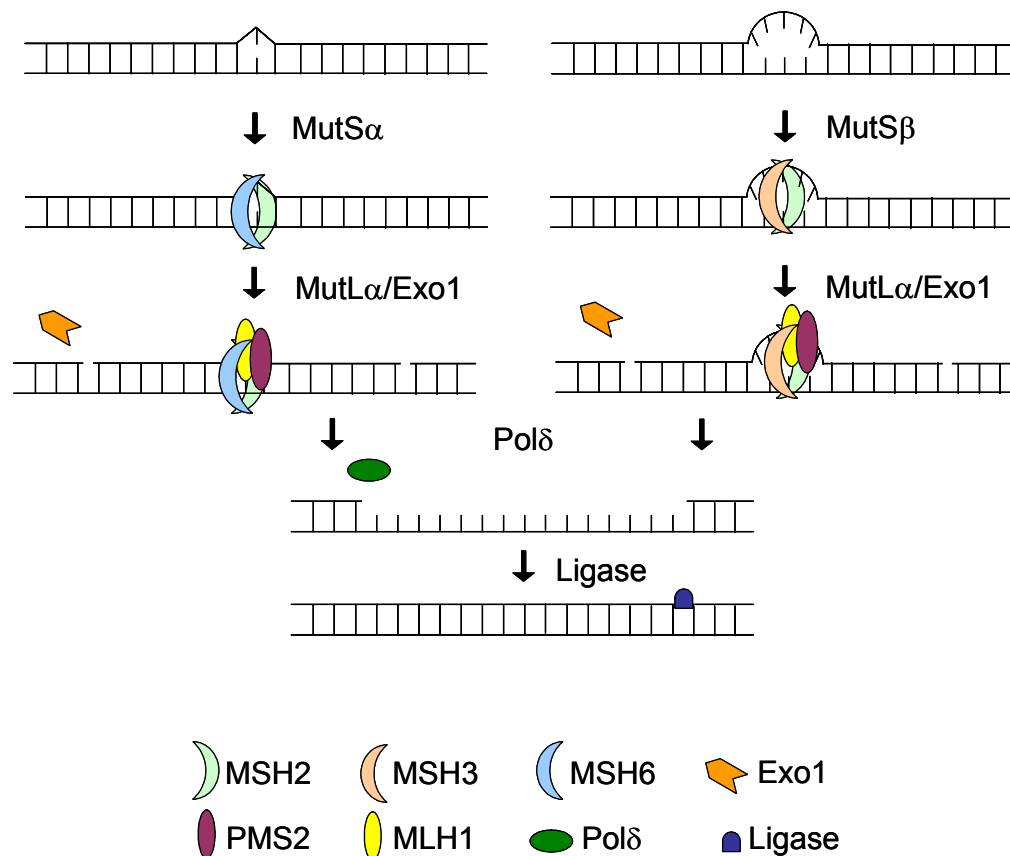


Abb. 1.1: Übersicht über die Fehlpaarungsreparatur (*mismatch repair* - MMR).

Dargestellt ist die Korrektur einer Fehlpaarung (links) und einer IDL Struktur (rechts). In beiden Fällen entspricht der obere Einzelstrang dem neu synthetisierten. Die Fehlpaarung wird von MutSα (MSH2·MSH6) erkannt und die IDL Struktur von MutSβ (MSH2·MSH3). Nach Bindung dieser Heterodimere wird in beiden Fällen MutLα (MLH1·PMS2) rekrutiert, das über eine endonukleolytische Aktivität Einzelstrangbrüche erzeugen kann. Ein 5' von der zu entfernenden Struktur liegender Einzelstrangbruch dient als Startpunkt für den 5'-3' Abbau der fehlerhaften Sequenz durch Exo1. Die Reparatursynthese erfolgt über Polδ und eine vermutlich von Ligase 1 vermittelte Ligationsreaktion schließt die Reparatur ab.

Die Fehlererkennung erfolgt über MutSα und MutSβ, die aufgrund ähnlicher Substratspezifität eine weitgehend funktionelle Redundanz aufweisen. Während MutSα sämtliche Fehlpaarungen sowie ein bis acht Nukleotide umfassende IDLs erkennt, ist MutSβ nur an der Reparatur von IDLs beteiligt, die zwei bis acht Nukleotide umfassen (Genschel et

al. 1998). Im nächsten Schritt wird MutL α rekrutiert. Dessen Untereinheit PMS2 ist endonukleolytisch aktiv und kann daher Einzelstrangbrüche erzeugen (Kadyrov et al. 2006). Ein 5' von dem DNA Fehler gelegener Einzelstrangbruch dient als Eintrittspforte für die Exonuklease Exo1 (Genschel et al. 2002), die die fehlerhafte Sequenz in 5'-3' Richtung abbaut. Die Excision wird etwa 100 Nukleotide hinter dem Fehler beendet (Übersicht in Iyer et al. 2004) und der verbleibende Einzelstrang wird von RPA stabilisiert (Lin et al. 1998; Ramilo et al. 2002). Die Reparatursynthese erfolgt über Pol δ , wobei möglicherweise auch Pol α und Pol ϵ eine Rolle spielen (Übersicht in Iyer et al. 2006). Die abschließende Ligationsreaktion wird wahrscheinlich von Ligase1 durchgeführt (Übersicht in Jiricny 1998).

1.2. Besonderheiten der MMR

Da die MMR im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit steht, soll auf ihre Komponenten sowie auf ihre Funktionen im Folgenden ausführlicher eingegangen werden. Dabei werden insbesondere Details der Fehlererkennung und des Reparaturprozesses behandelt. Darüber hinaus wird die Beteiligung von MMR an der Zellzykluskontrolle und der Induktion von Apoptose sowie an weiteren zellulären Prozessen besprochen.

1.2.1. MMR Proteine

An spezifischen humanen MMR Proteinen sind MSH2, MSH3, MSH4, MSH5 und MSH6 zu nennen sowie MLH1, MLH3, PMS1 und PMS2. Dabei leiten sich die Bezeichnungen MSH und MLH von den zuerst in Bakterien gefundenen MMR Komponenten MutS und MutL ab und stehen für MutS Homolog bzw. MutL Homolog. PMS ist die Abkürzung für *post-meiotic segregation protein*. MSH2 bildet zusammen mit MSH6 bzw. MSH3 die Heterodimere MutS α und MutS β . Sie sind an der Fehlerkorrektur während mitotischer Prozesse beteiligt. MSH4 und MSH5 hingegen scheinen ausschließlich in meiotische Prozesse involviert zu sein. Auch MLH1 bildet Heterodimere, und zwar MutL α mit PMS2 und MutL β mit PMS1. Vermutlich bildet es einen dritten Komplex mit MLH3. Ein solcher Komplex konnte in *Saccharomyces cerevisiae* nachgewiesen werden. Während MutL α an mitotischen Prozessen beteiligt ist, ist die Funktion von MutL β noch unklar. Für humanes MLH3 konnte nur eine

Beteiligung an meiotischen Prozessen eindeutig nachgewiesen werden (Übersicht in Iyer et al. 2006).

1.2.2. Struktur der Proteine MSH2, MSH3 und MSH6

Die vorliegende Arbeit konzentriert sich im Wesentlichen auf die zur Fehlererkennung befähigten MMR Proteine MSH2, MSH3 und MSH6. Daher soll an dieser Stelle ein Überblick über die Strukturen und Funktionen dieser drei Proteine gegeben werden. Über Röntgenstrukturanalysen von humanem MutS α sowie vom MutS Protein von *Thermus aquaticus* mit einem anschließenden Sequenzvergleich unter Annahme struktureller Homologie konnten den humanen Proteinen MSH2, MSH3 und MSH6 jeweils fünf verschiedene Domänen zugeordnet werden (Warren et al. 2007; Obmolova et al. 2000). Diese sind als DNA Binde-Domäne, Anschluss-Domäne, Hebel-Domäne, Klammer-Domäne und ABC-ATPase-Domäne charakterisiert. Dabei finden über die Anschluss-Domäne vermutlich Protein-Protein-Interaktionen statt, während die Hebel-Domäne wahrscheinlich an einer Signalübertragung zwischen der DNA Binde-Domäne und der ABC-ATPase-Domäne beteiligt ist. Die Klammer-Domäne trägt zu einem unspezifischen Kontakt zwischen Protein und homologen DNA Sequenzen in Nachbarschaft einer Fehlpaarung bei. Neben der Bindung von ADP/ ATP und der Umsetzung von ATP findet über die ABC-ATPase-Domänen die Heterodimerisierung der jeweiligen Bindungspartner MSH2 und MSH6 bzw. MSH2 und MSH3 statt (Warren et al. 2007; Obmolova et al. 2000). Zur besseren Übersicht sind die drei Proteine mit den genannten Domänen in Abbildung 1.2a schematisch dargestellt. Aus dieser Darstellung geht auch hervor, dass MSH3 und MSH6 sowohl ein PCNA Bindemotiv (PIP-Box) als auch ein Zellkern-Lokalisationssignal (*nuclear localization signal* - NLS) besitzen, was für MSH2 nicht der Fall ist (Kleczkowska et al. 2001; <http://cubic.bioc.columbia.edu/cgi/var/nair/resonline.pl>). Um die räumliche Struktur von MutS α zu veranschaulichen ist in Abbildung 1.2b ein Ribbon-Diagramm dieses Heterodimers dargestellt, das DNA mit einer G·T Fehlpaarung und ADP bindet.

Für MSH2, MSH3 und MSH6 wurden diverse Protein-Protein-Interaktionen beschrieben. In diesem Zusammenhang sind die von den PIP-Boxen von MSH6 und MSH3 vermittelten Interaktionen von MutS α bzw. MutS β mit PCNA zu nennen (Kleczkowska et al. 2001). Darüber hinaus wurden für MSH3 Interaktionen mit Exo1 und für MSH2 Interaktionen mit

Exo1, ATR, Chk1 und Chk2 nachgewiesen (Schmutte et al. 1998; Wang & Qin 2003; Brown et al. 2003; Adamson et al. 2005).

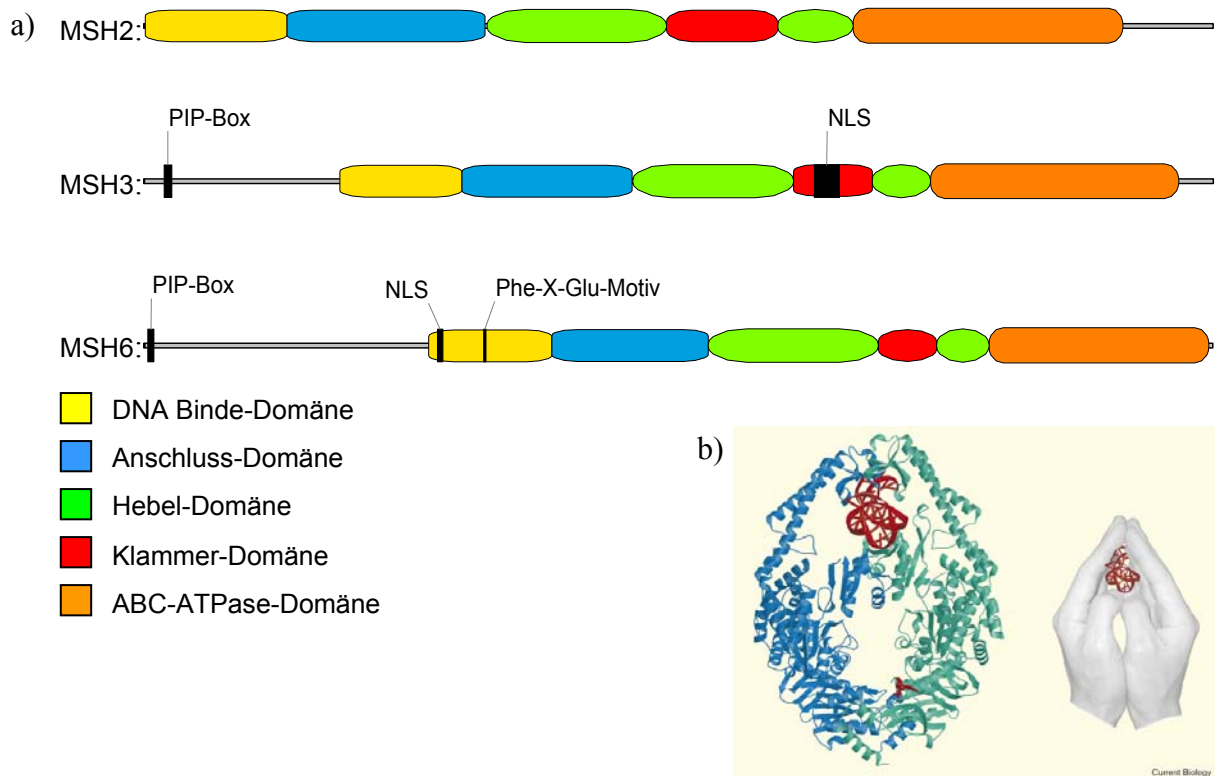


Abb. 1.2: Struktur der MSH Proteine.

a) Schematische Darstellung der Proteindomänen und weiterer Motive von humanem MSH2, MSH3 und MSH6. Gleiche Domänen sind mit gleichen Farben gekennzeichnet, weitere Motive sind schwarz markiert. PIP-Box: PCNA Bindemotiv; NLS: Kernlokalisierungssignal; Phe-X-Glu-Motiv: über dieses Motiv erfolgt die Fehlpaarungserkennung (vgl. 1.2.4.).

b) Ribbon-Diagramm eines an eine heteroduplex DNA gebundenen MutS Homodimers aus *E. coli*. Dieses Homodimer weist strukturelle Homologie mit humanem MutSa auf. Die beiden Monomere sind in blau bzw. grün dargestellt, die heteroduplex DNA (oben) und ein gebundenes ADP Molekül (unten) in rot. Zur Veranschaulichung der MutS Struktur hat Jiricny (2000) das Modell der betenden Hände entwickelt, das in Abbildung 1.3 näher erläutert wird. Quelle: Jiricny (2000).

1.2.3. Strangdiskriminierung

Eine Besonderheit der MMR ist die Notwendigkeit der Strangdiskriminierung, da sich die falsch eingebaute Base im neu synthetisierten Strang befindet und aus diesem entfernt werden muss. Es wird angenommen, dass der neu synthetisierte Strang über freie Einzelstrangenden erkannt wird. Dafür spricht die Tatsache, dass Fehlpaarungen enthaltende Plasmide in Zellextrakten nur dann repariert werden können, wenn sie außer dem Fehler einen

Einzelstrangbruch enthalten, und dass die Reparatur vorrangig an dem Strang mit dem Einzelstrangbruch stattfindet (Thomas et al. 1991).

1.2.4. Fehlererkennung und Einleitung des MMR Prozesses

In Bezug auf MutS α sind einige Details über die MMR einleitenden Prozesse bekannt. Die Erkennung der Fehlpaarung erfolgt über ein Phe-X-Glu-Motiv, das in Eukaryoten nur in MSH6 konserviert ist. Ein Austausch des Phe Restes durch Ala führte zu einem Verlust der DNA Bindeaktivität von MutS α . Die Fehlererkennung durch MutS α erfolgt also in Abhängigkeit von MSH6 (Dufner et al. 2000). Der Kontakt zwischen den Orten der Fehlpaarung und der Strangdiskriminierung wird vermutlich über die Fähigkeit von MutS α hergestellt, sich entlang der DNA bewegen zu können. Dieses Gleiten erfolgt nur in Anwesenheit von ATP und es existieren zwei Modelle, mit denen die Abhängigkeit von ATP erklärt werden kann. Das erste Modell besagt, dass es sich um eine aktive Bewegung handelt und dass die dafür notwendige Energie aus der ATP Hydrolyse gewonnen wird. Nach dem zweiten Modell erfährt MutS α nach Bindung einer Fehlpaarung und dem Austausch von ADP durch ATP eine Konformationsänderung, die die Diffusion in Form einer Gleitklammer entlang der DNA ermöglicht (Übersicht in Iyer et al. 2006). Für das zweite Modell sprechen vor allem Experimente mit homoduplex und heteroduplex Oligonukleotiden. Diese ergaben, dass MutS α nach Zugabe von ATP von beiden DNA Substraten dissoziiert. Wenn jedoch die Enden der Oligonukleotide blockiert wurden, dissoziierte MutS α nach Bindung von ATP nur von den homoduplex Oligonukleotiden, nicht aber von den heteroduplex Oligonukleotiden (Übersicht in Jiricny 2006). Das gleiche Ergebnis wurde erzielt, wenn anstelle von ATP das als nicht hydrolysierbar geltende ATP γ S eingesetzt wurde (Übersicht in Iyer et al. 2006). Aus den in diesem Abschnitt beschriebenen Beobachtungen hat Jiricny (2000) ein sehr anschauliches Modell zur Bindung von MutS α an eine Heteroduplex DNA entwickelt, das in Abbildung 1.3 vorgestellt wird.

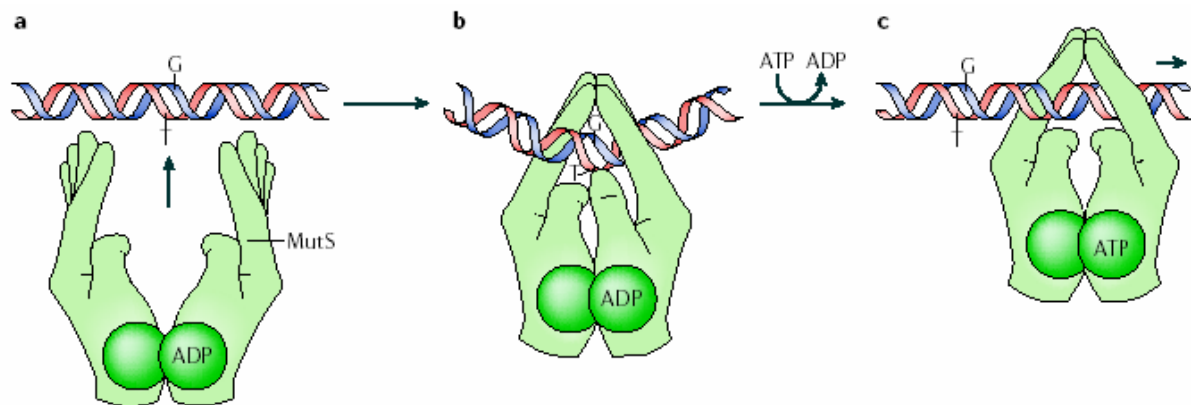


Abb. 1.3: Fehlererkennung durch MutSα nach dem Modell der betenden Hände von Jiricny (2000).

Bei diesem Modell stellt jede Hand einen der Heterodimerpartner dar. Im ungebundenen Zustand liegen die Hände nur an den Handbällen aufeinander, während die Finger geöffnet sind. In diesem Zustand ist ADP gebunden (a). Bei Kontakt mit der Heteroduplex DNA umschließen die Hände die DNA wie beim Gebet. Der Daumen der Hand, die MSH6 darstellt, greift in die kleine Furche der DNA und erkennt so die Fehlpaarung (b). Ein Austausch von ADP gegen ATP führt zu einer Konformationsänderung, bei der die Bindung zwischen Daumen und Fehlpaarung aufgehoben wird, die Hände die DNA aber weiterhin umschließen. So kann das Heterodimer an dem DNA Doppelstrang entlanggleiten (c). Quelle: Jiricny (2006).

Nach einem weiteren Modell handelt es sich bei der MMR um einen co-replikativen Prozess, bei dem MutSα während der Replikation an PCNA gebunden ist. Die Bindung einer Fehlpaarung führt zur Dissoziation von PCNA (Lau & Kolodner 2003). Der Mechanismus, über den MutSβ Fehler erkennt, ist derzeit noch unbekannt (Jiricny 2006).

Neben der Reparatur von Replikationsfehlern ist MMR möglicherweise in die Reparatur von DNA Schäden involviert. So kann MutSα beispielsweise an DNA mit diversen UV induzierten Läsionen, wie Thymindimeren, [6-4] Photoprodukten und 8-Oxoguaninen binden, wobei sich die Affinität durch eine gleichzeitige Fehlpaarung erhöht (Wang et al. 1999; Mazurek et al. 2002). Die Fähigkeit von MutSα an O⁶-Methylguanin zu binden wird kontrovers diskutiert. In einigen Arbeiten wurde eine Bindung ausschließlich im Zusammenhang mit einer Fehlpaarung beobachtet, in anderen Arbeiten konnte eine Bindung auch unabhängig davon gezeigt werden. (Übersicht in Iyer et al. 2006).

1.2.5. Bidirektionale Reparatur

Aus Arbeiten von Fang & Modrich (1993) geht hervor, dass die von einer Fehlpaarung bzw. einer IDL Struktur und einem Einzelstrangbruch abhängige Excision stets den kürzesten Weg zwischen diesen beiden Orten auf einem Plasmid betrifft. Daher kann man einem

Einzelstrangbruch auf einem Plasmid eine Position 5' oder 3' von der Fehlpaarung bzw. der IDL Struktur zuordnen. Dies ist von Bedeutung, da Untersuchungen mit entsprechenden Plasmiden und aufgereinigten Proteinen zeigten, dass je nach Position des Einzelstrangbruchs relativ zum DNA Fehler unterschiedliche Proteine für die Excision und die Reparatur erforderlich sind. Liegt der Einzelstrangbruch 5' von dem DNA Fehler, so findet die Excision bereits in Anwesenheit von MutS α , Exo1 und RPA statt. Dabei erhöht die Zugabe von MutL α die Spezifität der Reaktion für Substrate mit Fehlpaarung gegenüber fehlerfreien Substraten (Genschel & Modrich 2003). Liegt der Einzelstrangbruch jedoch 3' von dem Fehler, so erfordert die Excision MutS α , Exo1, RPA, MutL α , RFC und PCNA (Dzantiev et al. 2004). Wurde zu den beiden Systemen Pol δ zugegeben, so konnte eine Reparaturaktivität nachgewiesen werden. Diese erforderte für das Plasmid mit dem 5' gelegenen Einzelstrangbruch kein MutL α , aber PCNA und RFC. Das Plasmid mit dem 3' gelegenen Einzelstrangbruch wurde nur in Anwesenheit aller genannten Komponenten repariert (Constantin et al. 2005). Aus diesen Untersuchungen ist ersichtlich, dass die Synthese während der MMR in jedem Fall PCNA und RFC erfordert und dass diese beiden Proteine außerdem an der Induktion der Excision beteiligt sind, sofern ein Einzelstrangbruch 3' vom Fehler gelegen ist. Eine Abhängigkeit der MMR von PCNA schon vor Beginn der Reparatursynthese wurde auch von Umar et al. (1996) beschrieben.

1.2.6. Zellzykluskontrolle und Apoptose

In den letzten Jahren wurden verschiedene Hinweise darauf gefunden, dass MMR Funktionen ausübt, die über die bloße DNA Reparatur hinausgehen. Dazu zählen die Zellzykluskontrolle und die Induktion von Apoptose. So konnte ein MMR abhängiger S-Phase Arrest nach Behandlung mit ionisierender Strahlung, UVB Bestrahlung und nach Behandlung mit alkylierenden Agenzien gezeigt werden (Brown et al. 2003; van Oosten et al. 2005; Yoshioka et al. 2006). Ebenso wurde eine Abhängigkeit des G2/M Arrestes von MMR nach Behandlung mit alkylierenden und weiteren chemischen Agenzien beobachtet (Aquilina et al. 1999; Marquez et al. 2003). Darüber hinaus liefert der Nachweis der Interaktion von MSH2 mit Chk1 und Chk2 einen weiteren Hinweis auf die Beteiligung von MMR an der Zellzykluskontrolle (Adamson et al. 2005). Eine Beteiligung von MMR an der Induktion von Apoptose wurde über Vergleiche MMR defizienter und MMR profizienter Zellen gezeigt.

Hierbei erwiesen sich MMR defiziente Zellen als resistenter gegenüber ionisierender Strahlung, UVB Strahlung und verschiedenen chemischen Agenzien als die entsprechenden Wildtyp Zellen (Fritzell et al. 1997; Young et al. 2004; Wu et al. 1999). Außerdem konnten Zhang et al. (1999) eine Induktion von Apoptose nach Überexpression von MSH2 und MLH1 nachweisen.

Es existieren zwei Modelle dafür, wie MMR Proteine den Zellzyklusarrest oder die Apoptose auslösen (Übersicht in Iyer et al. 2006). Das erste Modell geht davon aus, dass die geschädigte DNA zunächst repliziert wird, wobei die Replikation über einen Umgehungsmechanismus unter Beteiligung einer Transläsionspolymerase erfolgt. Bei diesem Mechanismus entstehen viele Fehlpaarungen, insbesondere an den geschädigten Basen. Diese Fehlpaarungen werden vom MMR System erkannt und entfernt. Da MMR die fehlgepaarte Base aus dem neu synthetisierten Strang entfernt, nicht aber die geschädigte Base aus dem parental Strang, wird dieser gegenüber während der Reparatursynthese erneut eine falsche Base eingebaut. Der Prozess der Excision und Reparatursynthese wiederholt sich und dabei auftretende Intermediate führen schließlich zum Zellzyklusarrest oder zur Apoptose (Übersicht in Iyer et al. 2006). Für dieses Modell spricht die Beobachtung, dass der Zellzyklusarrest oft erst im zweiten Zellzyklus nach der DNA Schädigung nachgewiesen werden kann (Yoshioka et al. 2006; Schroering et al. 2007). Das zweite Modell nimmt an, dass die MMR Komponenten möglicherweise zusammen mit anderen Proteinen direkt zu dem DNA Schaden rekrutiert werden und der sich bildende Komplex den Zellzyklusarrest oder die Apoptose auslöst. Dieses Modell wird durch die nachgewiesenen Interaktionen von MSH2 mit ATR, Chk1 und Chk2 sowie von MLH1 mit ATM unterstützt (Wang & Qin 2003; Adamson et al. 2005; Brown et al. 2003). Außerdem wurden Experimente mit MSH2 und MSH6 Proteinen gemacht, deren ATP Bindestellen zerstört waren. Zwar konnten diese Proteine DNA binden, aber MMR konnten sie nicht auslösen. Trotzdem war die Sensitivität gegenüber methylierenden Agenzien in den diese Proteine exprimierenden Zellen unverändert (Lin et al. 2004; Yang et al. 2004).

1.2.7. Weitere Prozesse, an denen MMR beteiligt ist

Abschließend soll auf zwei weitere Prozesse eingegangen werden, in die MMR involviert ist. Dabei handelt es sich um Rekombination und um somatische Hypermuation.

Die Beteiligung von MMR an Rekombinationsprozessen wie homologer Rekombination oder *crossing over* hängt mit der Fähigkeit der Erkennung von Fehlpaarungen zusammen. Es wird vermutet, dass MMR Proteine eine Rekombination verhindern können, indem sie das Eindringen der invasiven DNA Stränge sowie die Schenkelwanderung verhindern. Eine erhöhte Frequenz von Rekombinationsereignissen zwischen nicht vollständig homologen Sequenzen bei defekter MMR unterstützt diese Annahme. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass von Genkonversion betroffene Bereiche in Zellen mit MMR Defekten länger sind als in Zellen mit funktionaler MMR. Dies deutet an, dass MMR Rekombinationsereignisse nicht nur von Vornherein verhindert, sondern auch nach bereits erfolgter MMR frühzeitig beendet (Übersicht in Jiricny 2006).

Die somatische Hypermutation ist ein Prozess, der in B-Zellen stattfindet und zur Reifung von Antikörpern beiträgt. In definierten Bereichen wird Cytosin zunächst über die aktivierungsinduzierte Cytidin-Deaminase (AID) zu Uracil umgewandelt. Anschließend wird das Uracil über die Uracil-DNA Glycosylase (UNG) entfernt, so dass eine abasische Stelle entsteht. Dieser gegenüber wird bei der folgenden Replikation mittels Translasiationspolymerasen ein quasi beliebiges Nukleotid eingebaut. Über diesen Mechanismus lassen sich Mutationen an G·C Paaren erklären. Aber auch A·T Paare sind von der somatischen Hypermutation betroffen. Es wird angenommen, dass die G·U Fehlpaarung eine mehrere Nukleotide umfassende Excisionsreparatur auslösen kann, bei der die DNA Reparatur-synthese von einer Translasiationspolymerase katalysiert wird. Da diese nicht fehlerfrei arbeitet, können inkorrekte Basen eingebaut werden, unter anderem gegenüber von A und T (Übersicht in Neuberger & Rada 2007). Eine Beteiligung von MMR an diesem Prozess wird angenommen, da MMR Defekte die Häufigkeit von Mutationen speziell an A·T Basenpaaren reduzieren (Übersicht in Jiricny 2006). Bei der somatischen Hypermutation scheinen MMR Proteine die Entstehung von Fehlpaarungen also zu fördern, anstatt sie zu korrigieren. Wie diese gegensätzlichen Funktionen ausgeübt und reguliert werden, ist zurzeit ungeklärt.

1.2.8. Neuere Bedeutung der MMR

MMR ist in vielfältige zelluläre Prozesse involviert, über die sie erheblich zur Vermeidung von Tumorigenese beiträgt und vor allem MSH2 und MLH1 gelten inzwischen als Tumorsuppressoren. Dabei spielt sowohl die Beteiligung von MMR an der

Zellzykluskontrolle und der Induktion von Apoptose eine Rolle, als auch die Reparatur von Replikationsfehlern selbst. Letzteres wird besonders deutlich, wenn man sich die Auswirkungen eines defekten MMR Systems vor Augen hält. Replikationsfehler, die nicht repariert werden können, manifestieren sich als Mutationen. Diese Mutationen können unter anderem Tumorsuppressorgene oder Onkogene betreffen und schließlich zur Ausprägung von Krebserkrankungen führen. Eine ganze Gruppe von mit MMR Defekten in Zusammenhang stehenden Krebserkrankungen wird unter der Bezeichnung „hereditäres nichtpolypöses kolorektales Karzinom“ (HNPCC) zusammengefasst und unter 1.4. näher betrachtet. Zuvor soll ein Hauptmerkmal von Zellen mit defekter MMR besprochen werden, das als Mikrosatelliten Instabilität (MSI) bezeichnet wird und zur Identifizierung von MMR Defekten sowie zur Diagnose von HNPCC herangezogen wird.

1.3. Mikrosatelliten Instabilität (MSI)

Ein defektes MMR System führt zu MSI (Peltomäki 1994). Als Mikrosatelliten bezeichnet man DNA Sequenzen, die aus Einheiten von 1-4 Nukleotiden bestehen, die sich mehrfach wiederholen und tandemartig hintereinander gereiht sind. Solche Sequenzen sind an vielen Orten des Genoms zu finden. Die Länge der Sequenz eines bestimmten Mikrosatelliten ist im Regelfall in allen Zellen eines Individuums identisch. Das Phänomen unterschiedlicher Längen des gleichen Mikrosatelliten in verschiedenen Zellen eines Individuums wird als MSI bezeichnet. Es ist die Folge von Insertionen oder Deletionen, häufigen Replikationsfehlern an repetitiven Sequenzen, die wegen eines defekten MMR Systems nicht repariert werden können (Boland et al. 1998).

MSI ist ein Hauptmerkmal von Tumoren, die der Erkrankung HNPCC zugerechnet werden (vgl. 1.4.), denn mehr als 85 % dieser Tumore weisen MSI auf (Pedroni et al. 1999). Aber auch in einigen sporadischen Tumoren kann MSI nachgewiesen werden. Damit ist MSI ein sicherer Indikator für MMR Defekte und HNPCC, aber nicht spezifisch für HNPCC (Loukola et al. 2001).

Um MSI zu detektieren, können verschiedene Mikrosatelliten auf Veränderungen in ihrer Länge hin untersucht werden. Zur Gewährleistung eines internationalen Standards wurden 1997 fünf Marker bestimmt, die sich besonders gut zur Untersuchung von MSI eignen. Bei diesen sogenannten Bethesda-Markern handelt es sich um zwei Mononukleotid-Repeats

(BAT25 und BAT26) und drei Dinukleotid-Repeats (D5S346, D2S123 und D17S250). Längenveränderungen in zwei oder mehr der Marker werden als MSI-H (stark) eingestuft, in nur einem Marker als MSI-L (schwach) und in keinem Marker als MSS (stabil) (Boland et al. 1998).

Eine Besonderheit den Marker BAT26 betreffend ist die Tatsache, dass er quasimonomorph ist. Das heißt, dass beide Allele eines Individuums sowie sämtliche Allele verschiedener Individuen die gleiche Länge besitzen (Hoang et al. 1997), nämlich 26 aneinandergereihte Adenine. Ausnahmen wurden bislang in 7,7-12,6 % der Afroamerikaner und in nur 0,08 % der Kaukasier gefunden (Pyatt et al. 1999; Samowitz et al. 1999).

Mikrosatelliten finden sich sowohl in nicht codierenden Bereichen des Genoms als auch in solchen, die für bestimmte Proteine codieren. Aus diesem Grund können von MSI Gene betroffen sein, deren codierende Sequenzen Mikrosatelliten enthalten wie beispielsweise MSH3, MSH6 und TGF β RII (Übersicht in Peltomäki 2001). Letzteres enthält einen PolyA(10) Abschnitt, der in mehr als 90 % der kolorektalen HNPCC Tumore mit MSI mutiert ist (Parsons et al. 1995).

1.4. HNPCC

Eine ganze Gruppe von vererbaren Krebserkrankungen zeichnet sich durch Defekte im MMR System aus. Diese Erkrankungen werden unter der Bezeichnung „hereditäres nichtpolypöses kolorektales Karzinom“ (*hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma* - HNPCC) zusammengefasst. Aus diesem Namen müsste man schließen, dass es sich um eine Gruppe von Tumorerkrankungen handelt, die ausschließlich den Darm betreffen. Tatsächlich umfasst die HNPCC aber ein relativ weites Feld von Tumorerkrankungen. Man unterscheidet heute als Untergruppen der HNPCC das Lynch Syndrom I (kolorektale Tumore), das Lynch Syndrom II (kolorektale und außer-kolonische Tumore, beispielsweise der Gebärmutter-schleimhaut, des Magens etc.), das Muir-Torre Syndrom (Talgdrüsen-Tumore und Keratoacanthome) und das Turcot Syndrom (Gehirn-Tumore und kolorektale Adenome) (Übersicht in Felton et al. 2007b). Viele HNPCC Patienten weisen außerdem Symptome auf, die typisch für die Erkrankung Neurofibromatosis Typ 1 sind. Diese Symptome umfassen vor allem Café-au-Lait-Flecken (*café-au-lait spots* - CALS) und Neurofibrome. Neurofibromatosis Typ 1 an sich wird durch Mutationen im Gen für Neurofibromin (NF1) verursacht. Es

wird spekuliert, dass MMR Defekte zu Mutationen im NF1 Gen führen, da in einigen MSI Zelllinien Veränderungen in diesem Gen nachgewiesen werden konnten. Ein kausaler Zusammenhang konnte bislang allerdings nicht bewiesen werden (Übersicht in Felton et al. 2007a).

Gemeinsam ist diesen Erkrankungen eine vererbte Mutation in einem MMR Gen (Übersicht in Felton et al. 2007a). Dabei ist in ca. 50 % der Fälle das Gen MLH1 betroffen, in ca. 40 % der Fälle das Gen MSH2 und in ca. 10 % der Fälle das Gen MSH6 (Peltomäki 2005). In seltenen Fällen wurden auch Mutationen im Gen PMS2 als Ursache für den Tumor gefunden (Peltomäki & Vasen 2004). In der Regel ist nur ein Allel des entsprechenden Gens mutiert und die Tumorentstehung aufgrund eines MMR Defekts erfolgt erst dann, wenn das zweite Allel eine somatische Mutation erfährt und somit kein funktionales Protein mehr exprimiert werden kann. Replikationsfehler können also nicht mehr repariert werden. Erst wenn von solchen zufälligen Fehlern für die Tumorigenese entscheidende Gene betroffen sind, kann dies zur Tumorentstehung führen. Zum Ausbruch der Krebserkrankung kommt es in diesen Fällen zwischen dem 40. und 60. Lebensjahr eines Patienten (Übersicht in Felton et al. 2007a).

Inzwischen werden immer mehr Fälle bekannt, in denen beide Allele eines MMR Gens mit Mutationen vererbt werden. In manchen Fällen führt dies dazu, dass MMR niemals stattfinden kann. Die Tumorigenese beginnt entsprechend früh, in der Regel in den ersten 10 Lebensjahren. Meist entstehen Tumore des hämatologischen Systems oder des Gehirns. In anderen Fällen ist eine Restfunktion des betroffenen Proteins vorhanden und die Tumorigenese beginnt etwas später, nämlich zwischen dem 10. und dem 40. Lebensjahr. Hier werden in der Regel Tumore des hämatologischen Systems, des Gehirns oder des Gastrointestinaltrakts ausgebildet (Übersicht in Felton et al. 2007a). Aufgrund der Unterschiede gegenüber den übrigen HNPCC-Erkrankungen vor allem im Hinblick auf die betroffenen Organe und das Alter des Krankheitsausbruchs wurde vorgeschlagen, diese Erkrankungen in einer neuen Untergruppe zusammenzufassen, die als Lynch Syndrom III bezeichnet werden soll (Felton et al. 2007b).

Neben Darmtumoren, die der vererbaren HNPCC zugerechnet werden, finden sich auch sporadische Tumoren in diesem Organ. Von letzteren haben nur etwa 15 % MSI (Pedroni et

al. 1999). Der zugrundeliegende Defekt des MMR Systems geht in diesen Fällen meist auf die Promotermethylierung des Gens MLH1 zurück (Cunningham et al. 1998).

In der Bundesrepublik Deutschland werden jährlich je 100.000 Einwohner 25 neue Fälle von Darmtumoren diagnostiziert. Bei Männern ist Darmkrebs mit 15 % nach Lungen- (22 %) und Prostatakrebs (16 %) die dritthäufigste Tumorerkrankung in Deutschland. Bei Frauen nimmt der Darmkrebs mit 15 % sogar die zweite Stelle nach dem Mammakarzinom (22 %) ein. Bei 10 % aller Tumorerkrankungen des Darms handelt es sich um HNPCC. Das heißt, dass von den 82.500.000 Einwohnern der Bundesrepublik Deutschland jährlich etwa 2.060 Menschen an diesem Krebs erkranken (<http://www.lrz-muenchen.de/~tumorgen/Lehrreiches/HNPCC/hnpcc.html>).

1.5. Spleißen

Als Spleißen wird ein Prozess bezeichnet, bei dem auf dem Weg vom Gen zum Protein die Introns aus der Prä-mRNA ausgeschnitten und die verbleibenden Exons miteinander verbunden werden. Wenn über regulierte Spleißprozesse verschiedene mRNAs aus einer Prä-mRNA erhalten werden, so spricht man von alternativem Spleißen. Da folglich ausgehend von einem Gen verschiedene Proteinisoformen exprimiert werden können, führt alternatives Spleißen zu erhöhter Proteindiversität (Maniatis & Tasic 2002).

Für ein korrektes Spleißen sind auf dem Transkript vor allem Sequenzabschnitte von Bedeutung, die als 5'-Spleißstelle oder Spleißdonor, 3'-Spleißstelle oder Spleißakzeptor, Verzweigungsstelle und Polypyrimidinabschnitt bezeichnet werden (Abb. 1.4). Spleißdonoren und -akzeptoren umfassen jeweils nur zwei stark konservierte Nukleotide, nämlich GU am 5' Ende des Introns und AG am 3' Ende des Introns. Sie werden von relativ kurzen und weniger konservierten Sequenzen flankiert. Auch die Verzweigungsstelle, die sich 5' des Polypyrimidinabschnitts befindet, ist im menschlichen Genom nur wenig konserviert (Übersicht in Padgett et al. 1986).

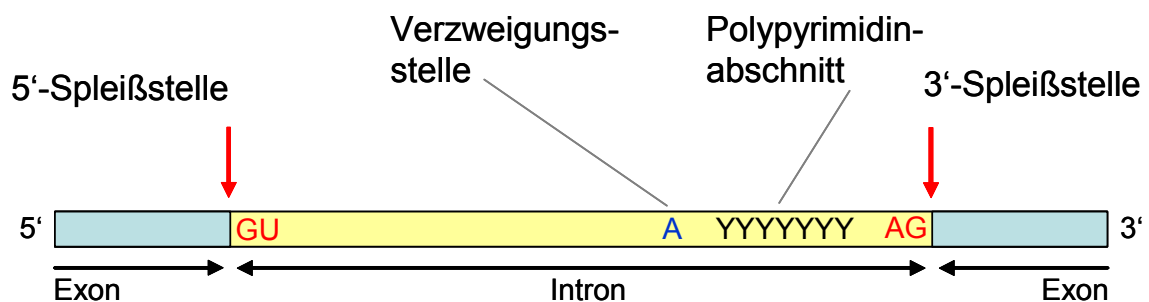


Abb. 1.4: Für den Spleißprozess wichtige Sequenzen der Prä-mRNA.

Dargestellt ist ein Ausschnitt aus einer Prä-mRNA mit den beiden Spleißstellen, der Verzweigungsstelle und dem Polypyrimidinabschnitt in der Intronsequenz.

Der Spleißprozess wird von einem als Spleißosom bezeichneten makromolekularen Komplex durchgeführt, der sich aus *small nuclear ribonucleoproteins* (snRNPs) und Proteinen zusammensetzt. Die beiden snRNPs U1 und U2 binden an die 5' Spleißstelle bzw. an die Verzweigungsstelle. Dabei wird die Bindung von U2 vom an den Polypyrimidinabschnitt bindenden Protein U2AF erleichtert (Übersicht in Will & Lührmann 1997). In einem nächsten Schritt binden die snRNPs U4/U6 und U5 an das Transkript. Nach Dissoziation von U1 und U4 vermittelt U6 den Schnitt am Spleißdonor (Makarov et al. 2002). Das dabei frei werdende Exon wird von U5 gebunden, während das 5' Intronende an die Verzweigungsstelle gebunden wird, wodurch die sogenannte Lariat- oder Lassostruktur entsteht. Durch einen Schnitt am Spleißakzeptor wird das Intron auch vom zweiten Exon abgetrennt und die beiden Exons können miteinander ligiert werden (Übersicht in Newman 1997).

Zusätzlich zu den Spleißstellen, der Verzweigungsstelle und dem Polypyrimidinabschnitt sind weitere Sequenzen für korrektes Spleißen erforderlich. Diese werden entsprechend ihrer Position und ihrem Einfluss auf den Spleißprozess als Exon-Spleißverstärker (*exonic splicing enhancers* - ESEs), Exon-Spleißrepressoren (*exonic splicing silencers* - ESSs), Intron-Spleißverstärker (*intronic splicing enhancers* - ISEs) und Intron-Spleißrepressoren (*intronic splicing silencers* - ISSs) bezeichnet (Übersicht in Blencowe 2006). Mutationen in einem oder mehreren der genannten Sequenzabschnitte, die für korrektes Spleißen erforderlich sind, können zu aberrantem Spleißen führen. Dabei werden Spleißstellen entweder vollständig übergangen oder der Spleißapparat setzt die Schnitte an sogenannten kryptischen Spleißstellen, da die korrekten Spleißstellen nicht erkannt werden (Übersicht in Blencowe

2006). Schätzungsweise 15 % der genetisch bedingten Erkrankungen gehen auf Punktmutationen in direkter Nachbarschaft zu Spleißstellen zurück, die ein inkorrektes Spleißen der betroffenen Gene verursachen (Krawczak et al. 1992). Unter Berücksichtigung der weiter entfernt liegenden ESEs, ESSs, ISEs und ISSs, steigt der Schätzwert auf 50 % an (Übersicht in Blencowe 2006).

An ESEs, ESSs, ISEs und ISSs bindende Faktoren regulieren den Aufbau des Spleißosoms an der Prä-mRNA. Daher bestimmen diese Faktoren darüber, wann welche Spleißstelle genutzt wird und je nach Vorhandensein spezifischer Faktoren kann eine Prä-mRNA unterschiedlich bzw. alternativ gespleißt werden. Die mit etwa einem Drittel häufigste Art von alternativem Spleißen führt dazu, dass ein komplettes Exon aus dem Transkript ausgeschnitten oder eingebunden wird. Eine mit zusammen etwa 25 % ebenfalls häufige Form des alternativen Spleißens ist die Nutzung alternativer 5' oder 3' Spleißstellen innerhalb von Exons. Weitere Formen führen zur Einbindung von Intronsequenzen in die mRNA oder zur Einbindung sich gegenseitig ausschließender Exons. Die Nutzung alternativer Promotoren sowie alternativer Polyadenylierungsstellen, die zu einer Veränderung des 5' bzw. 3' Bereichs der mRNA führen, wird in diesem Zusammenhang ebenfalls aufgeführt (Übersicht in Blencowe 2006). Die Prozessierung der Prä-mRNA findet co-transkriptionell statt und neben Spleißaktivatoren und -repressoren, die an ESEs, ESSs, ISEs und ISSs binden, wird alternatives Spleißen auch über die Elongationsgeschwindigkeit reguliert, mit der die RNA Polymerase II das jeweilige Gen transkribiert. Diese wiederum ist abhängig vom Promotor, vom Phosphorylierungsstatus der C-terminalen Domäne der RNA Polymerase II sowie von diversen regulativen Sequenzen und Faktoren (Übersicht in Kornblihtt 2005). Johnson et al. (2003) untersuchten mehr als 10.000 humane Gene, die mehrere Exons umfassen, und stellten fest, dass mindestens 74 % dieser Gene alternativ gespleißt werden.

1.6. Zielsetzung

MMR ist der Reparaturprozess, der auf die Korrektur von Replikationsfehlern spezialisiert ist. Außerdem wird eine Beteiligung von MMR an vielfältigen über die Reparatur hinausgehenden Prozessen in der Literatur beschrieben. Einige Details zur Fehlererkennung und zum Reparaturprozess von Fehlpaarungen und IDLs sind bekannt. Auf der anderen Seite

gibt es viele ungeklärte Fragen, die vor allem die Einzelheiten der Beteiligung von MMR an der Zellantwort auf diverse DNA Schäden und die Regulation von MMR betreffen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Herstellung eines Modellsystems zur Durchführung von *in vivo* Untersuchungen an den die Fehlererkennung realisierenden MMR Proteinen MSH2, MSH3 und MSH6. Dies sollte über die stabile Expression fluoreszenzgekoppelter Fusionsproteine in verschiedenen humanen Zelllinien erreicht werden. Schließlich sollte das Modellsystem Anwendung finden und die Beteiligung der genannten MMR Proteine an der Antwort auf UVA Bestrahlung *in vivo* untersucht werden. Dabei sollte über *live-cell imaging* erstmals eine Kinetik zur MMR Aktivität erstellt werden. Zudem sollten alternativ gespleißte Transkripte für MSH2, MSH3 und MSH6 nachgewiesen werden. Die Charakterisierung der entsprechenden Proteinvarianten sollte mittels stabiler Expression von fluoreszenzgekoppelten Fusionsproteinen erfolgen. Des Weiteren sollten Studien zur Regulation von MMR zur Erweiterung des Kenntnisstandes über einen bisher wenig behandelten Aspekt der MMR beitragen.

Vor allem im Hinblick auf die Erkrankungen, die ein defektes MMR System verursachen kann, ist die genaue Erforschung der Funktionen und der Regulation von MMR wichtig. Nur mit den entsprechenden Kenntnissen können die Konsequenzen spezieller Defekte des MMR Systems richtig eingeschätzt und Therapien entwickelt werden, die diesen Konsequenzen entgegenwirken.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Chemikalien, Enzyme und Kits

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Chemikalien, Enzyme und Kits wurden von den nachfolgend aufgeführten Firmen bezogen (Tab. 2.1). Sofern nicht anders vermerkt, wurden sämtliche Lösungen und Medien mit deionisiertem Wasser angesetzt, dessen Aufbereitung mit dem Wasseraufbereiter Milli-Q von Millipore erfolgte.

Tab. 2.1: Übersicht über die verwendeten Chemikalien, Enzyme und Kits.

Aufgeführt sind die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Chemikalien, Enzyme und Kits unter Angabe der jeweiligen Bezugsfirma und Katalog-Nummer.

Chemikalien, Enzyme bzw. Kits	Firma	Katalog-Nummer
1 Kb DNA Ladder (1 µg/µl)	Invitrogen	15615-024
6x Ladepuffer	Fermentas	R0611
10x Ligation Buffer	Fermentas	EL0015
10x PCR Puffer	Qiagen	201205
10x PCR Puffer	Takara	R007A
1-Butanol	Sigma	B7906-500ML
2-Mercaptoethanol	Fluka	63689
5x First-Strand Buffer	Invitrogen	18064-014
5x Q-Solution	Qiagen	201205
Aceton	J.T.Baker	8002
Acrylamid (30 %; 37,5:1)	Bio-Rad	161-0158
Agar Bacteriological (Agar No.1)	Oxoid	LP0011
Agarose	Invitrogen	15510-027
Ampicillin Sodium Salt	MP Biomedicals, Inc.	194526
Ammoniumacetat	Roth	7869.1
Ammonium Persulfate (APS)	Serva	13375
Aphidicolin (APC)	Sigma	A0781-1MG
Aprotinin (angesezt: 1 mg/ml)	Serva	13718
Bacto™ Tryptone	BD	211705
Bacto™ Yeast Extract	BD	212750
Benzonase (250 u/µl)	Merck	1.01695.0001
Bradford-Reagenz Protein Assay	Bio-Rad	500-0006
Bromphenolblau	Sigma	B-6131
CHAPS	Biomol	50058
Chloroform	J.T.Baker	7386
DMEM (1x)	Gibco	31885
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Riedel-de-Haën	60153
DNA Size Standard Kit - 400	BeckmanCoulter	608098
dNTP Mixture	Takara	R007A
DTT (0,1 M)	Invitrogen	18064-014
Essigsäure (100 %)	Roth	3738.5
Ethanol	J.T.Baker	8006
Ethidium-Bromid	Merck	1.022.250.001
Ethylenediaminetetraacetic acid Disodium salt Dihydrate (EDTA)	Fluka	3680
Fetal Bovine Serum (FBS)	Sigma	F4135
GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus (0,5 µg/µl)	Fermentas	SM0321
Glucose (= D(+)-Glucose-Monohydrat)	Merck	1.08342.2500
Glycerol (99 % GC)	Sigma	G6279-1L
Glycin	Roth	3908.2

HamF12 (1x)	Gibco	21765
Harnstoff (= Urea)	Sigma	U-1250
HCl	Roth	4625.2
High Pure PCR Template Preparation Kit	Roche	1 796 828
HiSpeed Plasmid Maxi Kit (25)	Qiagen	12663
Human TBP Endogenous Control	Applied Biosystems	4333769F
Immobiline™ DryStrip pH 6-11 (18 cm)	Amersham Biosciences	17-6001-97
IPG Puffer pH 3-10	GE Healthcare	17-6000-87
IPG Puffer pH 4-7	GE Healthcare	17-8000-86
IPG Puffer pH 6-11	GE Healthcare	17-6001-38
IPTG (angesetzt: 200 mg/ml in H ₂ O)	Promega	V3951
Isopropanol	J.T.Baker	8067
JETsorb Gel Extraction Kit / 300	Genomed	110300
Jodacetamid	Merck	8.04744.0100
K ₂ HPO ₄	Merck	1.05104.1000
Kaleidoscope Prestained Standards	Bio-Rad	161-0324
KaryoMAX® Colcemid® (10 µg/ml)	Gibco	15212-046
KCl	Fluka	60130
KH ₂ PO ₄	Merck	1.04873.1000
L-Glutamin (200 mM; 100x)	Gibco	25030-024
LiCl	Merck	1.05679.0250
McCoy's 5A	Gibco	22330
MEM (1x)	Gibco	31095
MEM Non-Essential Amino Acids (NEAS; 100x)	Gibco	11140-035
MEM Sodium Pyruvate (100 mM)	Gibco	11360-039
Methanol	J.T.Baker	8045
MethylDetector™	Active Motif	55001
Na ₂ HPO ₄ ·H ₂ O	Merck	1.065.801.000
NaCl	Roth	3957.1
NaOH	Roth	6771.1
Nuclear Complex Co-IP Kit	Active Motif	54001
Penicillin/ Streptomycin (5000 u/ml)	Gibco	15070-063
peqGOLD dNTP-Set 'Long Range' (je 100 µM)	Peqlab Biotechnologie GmbH	20-2111
Pepstatin (angesetzt: 10 mM in DMSO)	Serva	52682
PMSF (angesetzt: 20 mg/ml in Ethanol)	Serva	32395
Poly-L-Lysin	Sigma	P-4707
Propidiumiodid	Sigma	P-4170
Puromycin (10 mg/ml)	Sigma	P-9620
Random Primers	Invitrogen	N410-01
ReadyStrip™ IPG Strips pH 4-7 (17 cm)	Bio-Rad	163-2008
ReadyStrip™ IPG Strips pH 5-8 (24 cm)	Bio-Rad	163-2046
RNAse	Sigma	R-5503
RPMI 1640 (1x)	Gibco	21875
Silikonöl M100	Roth	4025.2
Sodium-Dodecylsulfate (SDS)	Serva	20763
Skim Milk Powder	Oxoid	LP0031
SLS Sample Loading Solution	BeckmanCoulter	608082
Streptavidin (gekoppelt mit <i>horseradish peroxidase</i>)	GE Healthcare	RPN1051V1
SuperFect® Transfection Reagent (3 mg/ml)	Qiagen	301307
SuperScript™ II Reverse Transcriptase (200 u/µl)	Invitrogen	18064-014
T4 DNA Ligase (1 Weiss u/µl)	Fermentas	EL0015
TaKaRa Taq™ Hot Start Version	Takara	R007A
Taq DNA Polymerase (5 u/µl)	Qiagen	201205
TaqMan Universal PCR Mastermix	Applied Biosystems	4364338
TEMED	Serva	35925
Tetracycline Hydrochloride	ICN Biomedicals Inc.	194542
Thioharnstoff	Fluka	88810
Trizma® base (Tris)	Sigma	T1503-1KG
Trizol	Invitrogen	15596-018
Trypane Blue Solution (0,4 %)	Sigma	T8154
Trypsin/ EDTA (0,05 %; 1x)	Gibco	25300
Tween® 20	Sigma	P1379-500ML
Western Lightning Chemiluminescence Reagent	PerkinElmer LAS, Inc.	NEL101
X-Gal (angesetzt: 50 mg/ml in Dimethylformamid)	Promega	V3941
X-Ray developer LX24	Kodak	507 0933
X-Ray fixer AL4	Kodak	507 1071

2.1.2. Verbrauchsmaterialien und Glasware

Tab. 2.2: Übersicht über die Verbrauchsmaterialien und Glasware.

Aufgeführt sind die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien sowie die verwendete Glasware unter Angabe der jeweiligen Bezugsfirma.

Verbrauchsmaterial bzw. Glasware	ggf. Bezeichnung, Firma
1-l-Kolben mit Schikane	Schott
250-ml-Sorvall-Dry-Spin-Bottles	Sorvall
500-ml-Kolben mit Schikane	Schott
Elektroporationsküvetten	Peqlab Biotechnologie GmbH
Filterpapier	Whatman
Folie zum Abkleben der Real-Time-PCR-Platten	Applied Biosystems
Gewebekulturschalen	Nunc TM Delta Surface, Nunc
Glaspipetten	Brand
Kapsenberg-Röhrchen	Falcon [®] , Becton Dickinson Labware
Kunststoffröhrchen (14 und 50 ml)	Falcon [®] , Becton Dickinson Labware
Kryoröhrchen	Nunc
Kulturflaschen (25, 80 und 175 cm ²)	Nunc
Kulturplatten (6, 12, 24 und 96 Wells)	Nunc
Mikrotiterplatten für Kapillarelektrophorese	BeckmanCoulter
Mikrotiterplatten für Real-Time-PCR	Applied Biosystems
Mineralöl	BeckmanCoulter
Pasteurpipetten	Brand
Petrischalen	Greiner
PVDF-Membran	Bio-Rad
Quarzküvetten	Omnilab
Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Biozym
Reaktionsgefäße (1,5 und 2,0 ml)	Eppendorf
Röhrchen für SS34 Rotor	Corex [®]
Röntgenfilm	Medical X-Ray Film (100 NIF, 18x24) Super RX, Fuji
Schott-Flaschen	Schott
Spitzen für Kombipipetten	Eppendorf
Spitzen für Mikropipetten	Eppendorf/ Greiner

2.1.3. Geräte

Tab. 2.3: Übersicht über die Geräte.

Aufgeführt sind die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Geräte unter Angabe der jeweiligen Bezugsfirma.

Gerät	ggf. Bezeichnung, Firma
Agarose-Gelelektrophorese-Apparatur	Horizon 58, Gibco BRL Horizon 11·14, Gibco BRL
Analysenwaagen	P200D, Sartorius P200S, Sartorius Laboratory, Sartorius
Autoklav	LTA 32/35, Zirbus
Brutschränke	Kelvitron [®] T, Heraeus Automatic CO ₂ Inkubator, Forma Scientific
Durchflusszytometer	FACScan, Becton Dickinson
Eismaschine	AF-100, Scotsman
Elektroblot-Apparatur	Semi-Dry Transfer Cell, Trans-Blot [®] SD
Elektroporations-Apparatur	EasyjecT Prima (2500 V), Equibio
Gasbrenner	Fireboy Eco, Tecnomara
Genetic Analysis System	CEQ TM 8000, BeckmanCoulter
Heizblöcke	Thermostat 5320, Eppendorf Thermomix comfort, Eppendorf

Heizplatte mit Rührer	Ikamag RCT, IKA®-Labortechnik
IEF System	IPGphor, Pharmacia Biotech
Kamera (am UV-Tisch)	EDAS 290, Kodak
Kryoboxen	Nalgene®
Kühlschränke (4 °C)	Liebherr
Mehrkanalpipetten	Titertek®
Mikropipetten (0,1 – 1000 µl)	Abimed, Eppendorf, Gilson
Mikroskope	Axioskop, Zeiss
	ID03, Zeiss
	Fluoreszenzmikroskop Labophot, Nikon
	Epifluoreszenzmikroskop Axiovert 100, Zeiss
	Konfokales Lasermikroskop LSM 510 Meta, Zeiss
Mikroskopzubehör für Labophot (Nikon):	
Filtersätze	Nikon
Mikroskopzubehör für Axiovert 100 (Zeiss):	
63x/1,25 NA Ölimmersionsobjektiv	Zeiss
Filtersätze	AHF Analysentechnik AG
Inkubationseinheit ΔTC3	Biopetechs
Digitale Kamera Spot-RT SE Monochrom	Diagnostics Instruments
Mikroskopzubehör für LSM 510 Meta (Zeiss):	
63x/1,4 NA Ölimmersionsobjektiv	Zeiss
Inkubationseinheit XL	Zeiss
Multipipetten	Eppendorf
PAGE-Apparatur	Bio-Rad
PAGE-Apparatur für IEF	Anderson-Iso-Dalt® Electrophoresis System, Hoefer Scientific Instruments
pH-Meter	Calimatic 766, Knick
Photometer	Genesys 10 UV, Thermo Spectronic
Pipettierhilfen	Pipetus® Standard, Hirschmann Laborgeräte
	Pipetus®, Hirschmann Laborgeräte
Real-Time-PCR-Apparatur	7500 Real Time PCR System, Applied Biosystems
Schüttler (Kolben und Röhrchen)	Certomat H, B. Braun Biotech International
	New Brunswick Scientific
	GFL 3015, Omnilab
	Certomat IS, Sartorius
SpeedVac	UNIVAPO 150 H, Zirbus
Sterilbänke	LaminAir® HLB 2472 GS, Heraeus
	SterilGARD Hood Class II Type A/B3, The Baker Company, Inc.
	Heraeus
Sterilisator	K Series Cryostorage System
Stickstofftanks	I-Cycler, Bio-Rad
Thermocycler	Liebherr
Tiefkühlschränke (-20 °C)	Bio-Freezer, Forma Scientific
Tiefkühlschränke (-80 °C)	Polystar® 423
Tischschweißgerät	Thermocenter, Zapf Instruments
Trockenschrank (60 °C)	Heraeus
Trockenschrank (80 °C)	GFL 3025, Omnilab
Über-Kopf-Schüttler	UV Transilluminator, UVP, Inc.
UV-Tisch	Sonoplus 200, Bandelin
Ultraschallgerät	Vibrox VF1 Electronic, Janke & Kunkel IKA®-Labortechnik
Vortexer	Milli-Q, Millipore
Wasseraufbereitungs-Anlage	Fisons D8-L, Haake
Wasserbäder	Köttermann Labortechnik
	Neubauer
Zählkammer	Kühlzentrifuge Allegra X-15R Centrifuge, BeckmanCoulter
Zentrifugen	Tischzentrifuge Centrifuge 5415 C, Eppendorf
	Tischzentrifuge Centrifuge 5415 D, Eppendorf
	Tischkühlzentrifuge 2K15C, Sigma
	Centrifuge 5804, Eppendorf
	Tischzentrifuge Sepatech Biofuge A, Heraeus
	Kühlzentrifuge 3K30, Sigma
	Kühlzentrifuge RC5C mit GSA und SS34 Rotor, Sorvall Instruments

2.1.4. Plasmide

pGEM[®]-T-Easy Vector System I (Promega; A1360)

pMC-EGFPP-N (erhalten von C. Mielke)

pMC-CFPP-N (erhalten von C. Mielke)

pMC-YFPP-N (erhalten von C. Mielke)

pMC2-DsRed-PCNA-H (erhalten von C. Mielke)

2.2. Bakterienkultur

2.2.1. Bakterienstämme

Sämtliche im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Plasmide wurden in *Escherichia coli* Bakterien vermehrt, und zwar in dem Stamm XL-1 Blue (Stratagene), der ein eigenes Resistenzgen gegen Tetracyclin besitzt.

2.2.2. Kulturmedien

Die Kultivierung von Bakterien erfolgt in LB (*luria broth*)- oder TB (*terrific broth*)-Medium.

LB-Medium: 10 g/l Bacto-Tryptone
 5 g/l Hefe-Extrakt
 10 g/l NaCl

Das LB-Medium wird autoklaviert. Ampicillin wird direkt vor Gebrauch in einer Endkonzentration von 50 mg/l von einer 1000fach konzentrierten Stammlösung in Wasser zugegeben. Tetracyclin wird in einer Endkonzentration von 12 mg/l verwendet. Die Tetracyclin-Stammlösung hat eine Konzentration von 12 g/l in 70 % Ethanol.

Zur Herstellung von Agarplatten werden vor dem Autoklavieren 13 g/l Agar zu dem LB-Medium gegeben. Der pH-Wert wird mit NaOH auf 7,0 korrigiert. Die Zugabe von Antibiotika erfolgt nach dem Abkühlen auf 60 °C direkt vor dem Ausgießen.

TB-Medium: 12 g/l Bacto-Tryptone
 24 g/l Hefe-Extrakt
 4 ml/l Glycerol

Salzlösung: 0,17 M KH_2PO_4
 0,72 M K_2HPO_4

Das TB-Medium und die Salzlösung werden getrennt voneinander autoklaviert. Vor Gebrauch wird die Salzlösung im Verhältnis 1:10 zu dem TB-Medium gegeben. Die Zugabe von Antibiotika erfolgt wie für das LB-Medium beschrieben.

2.2.3. Stammhaltung und Kultivierung

Die langfristige Lagerung der Bakterien erfolgt in Glycerol-Stocks bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Zu diesem Zweck werden 0,5 ml von einer in der exponentiellen Phase befindlichen Bakterienkultur 1:1 mit 10 %igem Glycerol vermischt, in ein Kryoröhrchen überführt und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Zur kurz- und mittelfristigen Lagerung über einen Zeitraum von maximal vier Wochen werden die Bakterien auf Agarplatten mit Selektionsdruck vermittelndem Antibiotikum ausgestrichen. Nach einer 16stündigen Inkubation bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ erfolgt die Lagerung bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, wobei die Platten durch Verschließen mit Parafilm vor dem Austrocknen geschützt werden. Die Kultivierung der *E. coli* Bakterien erfolgt als Flüssigkultur in den unter 2.2.2. angegebenen Medien bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ unter Schütteln. Werden größere Mengen der Bakterienkultur benötigt ($> 5\text{ ml}$), so wird zunächst eine Vorkultur von 2-5 ml von Agarplatten oder einem Glycerol-Stock angeimpft. Nach 6-8stündiger Inkubation wird diese Vorkultur in die Hauptkultur von bis zu 800 ml Medium überimpft. Es folgt eine Inkubation von 16 Stunden.

2.2.4. Herstellung elektrokompenter *E. coli* Bakterien (Stamm XL-1 Blue)

Über Nacht wird eine Vorkultur in 2 ml LB-Medium + Tetracyclin angezogen und nach 16stündiger Inkubation in eine Hauptkultur von 500 ml überimpft. Diese wird 3-4 Stunden lang inkubiert, bis sie bei Messung mit 600 nm eine optische Dichte von 0,7-0,8 erreicht hat. Die Bakterienkultur wird auf zwei sterile 250-ml-Sorvall-Dry-Spin-Bottles aufgeteilt und 30 min auf Eis gekühlt. Anschließend werden die Bakterien 15 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 4000 rpm zentrifugiert (Kühlzentrifuge RC5C mit GSA-Rotor, Sorvall Instruments). Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 10 ml eiskaltem deionisiertem Wasser resuspendiert. Die

Zentrifugation und der Waschschrift werden wiederholt. Anschließend wird erneut 15 min bei 4 °C und 4000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird in 10 ml 10 % Glycerol resuspendiert und 5 min bei 4 °C und 8000 rpm zentrifugiert (Kühlzentrifuge RC5C mit SS34-Rotor, Sorvall Instruments). Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 3,5 ml 10 % Glycerol aufgenommen. Es werden Aliquots von 50 µl auf vorgekühlte Eppendorf-Gefäße verteilt und bei -80 °C eingefroren. Die Lagerung kann über mehrere Monate erfolgen.

2.2.5. Transformation mittels Elektroporation

Zur Vermehrung von Plasmiden wird die Plasmid-DNA in *E. coli* Bakterien eingebracht. Die Plasmide vermitteln eine Resistenz gegen Ampicillin, so dass unter Selektionsdruck mit diesem Antibiotikum nur solche Bakterien wachsen können, die das Plasmid enthalten.

Je 50 µl noch gefrorener elektrokompeter *E. coli* Bakterien werden 3 µl frisch ligiertes oder 1 µl *supercoiled* Plasmid (1 ng/µl) zupipettiert. Dieser Ansatz wird in eine eisgekühlte Transformationsküvette mit 0,1 cm Schichtdicke gegeben. Unter Anlegen einer Spannung von 2500 V für etwa 4 sec findet die Elektroporation statt, während der die Plasmid-DNA von den Bakterien aufgenommen werden kann. Direkt im Anschluss werden 300 µl LB-Medium zugegeben. Soll eine Blau-Weiß-Detektion erfolgen (vgl. 2.2.9.), so werden 16 µl X-Gal und 4 µl IPTG zupipettiert. Die Bakterien werden auf Agarplatten mit Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag werden die Bakterienklone ausgezählt und die Transformationseffizienz E wird nach folgender Formel bestimmt:

$$E = \text{Anzahl der Kolonien} / \text{eingesetzte Plasmid-DNA in } \mu\text{g.}$$

2.2.6. Plasmidisolierung

2.2.6.1. Analytische Plasmidisolierung („Klare Lysate“)

Zur Charakterisierung von Plasmiden nach Klonierungsarbeiten werden die Plasmide zunächst im kleinen Maßstab isoliert. Dazu dient die von Birnboim und Doly (1979) beschriebene Methode der Analytischen Plasmidisolierung.

Es werden die folgenden vier Lösungen benötigt:

GET-Puffer:	50 mM	Glucose
	25 mM	Tris/HCl; pH 8,0
	10 mM	EDTA
Denaturierungs-Lsg.:	0,1 M	NaOH
	1 %	SDS
Renaturierungs-Lsg.:	7,5 M	Ammonium-Acetat
TE-Puffer mit RNase:	10 mM	Tris/HCl; pH 7,5
	1 mM	EDTA
	10 µg/ml	RNase

Die *E. coli* Bakterien werden über Nacht in 2 ml TB-Medium + Ampicillin angezogen. Nach 16stündiger Inkubation werden die Bakterien 1 min bei 8000 rpm zentrifugiert (Tischzentrifuge Centrifuge 5415 D, Eppendorf) und der Überstand wird verworfen. Die Bakterien werden in 200 µl GET-Puffer gründlich resuspendiert. Anschließend werden nacheinander 400 µl Denaturierungs-Lsg. und 300 µl Renaturierungs-Lsg. zugegeben, die zur Lyse der Bakterienzellen bzw. zum Ausfällen der Proteine führen. Das Mischen nach Zugabe dieser Lösungen sollte möglichst vorsichtig stattfinden, um den Kontakt zwischen der Bakterienmembran und dem Bakterienchromosom nicht zu zerstören. So wird gewährleistet, dass in dem anschließenden Zentrifugationsschritt (10 min bei 14000 rpm) lediglich die Plasmid-DNA in Lösung bleibt, während das Bakterienchromosom mit den übrigen Zellbestandteilen pelletiert wird. Die im Überstand enthaltene Plasmid-DNA wird mit 500 µl Isopropanol in einem 7minütigen Zentrifugationsschritt bei 14000 rpm gefällt. Nach dem Trocknen wird das Pellet in 100 µl TE-Puffer mit RNase aufgenommen.

2.2.6.2. Plasmidisolierung im großen Maßstab („Maxi-Präp“)

Zur Isolierung von Plasmid-DNA, die zur Transfektion eukaryotischer Zellen eingesetzt werden soll, wird das HiSpeed[®] Plasmid Maxi Kit (25) von Qiagen gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Dieses Kit ermöglicht die Plasmid-Isolierung im großen Maßstab bei einem hohen Reinheitsgrad. Die Methode basiert wie die der Analytischen Plasmidisolierung auf der alkalischen Lyse. Nach dem Ausfällen der Proteine wird die Plasmid-DNA über eine Filter-Membran gegeben, an die sie unter Niedrig-Salz-Bedingungen und saurem pH-Wert bindet. Mit einem Waschpuffer mit mittlerer Salzkonzentration werden RNA, Proteine und

weitere Verunreinigungen von geringem Molekulargewicht entfernt. Die Plasmide werden mit einem Puffer mit hoher Salzkonzentration eluiert. Über eine Isopropanolfällung wird die Plasmid-DNA aufkonzentriert und von Salzen befreit, ehe sie in TE-Puffer aufgenommen wird.

2.2.7. Restriktionsverdau

Das Schneiden von DNA unter Verwendung spezifischer Restriktionsendonukleasen dient einerseits der Rekombination von DNA im Rahmen von Klonierungen und andererseits der Charakterisierung von Plasmiden. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen mitsamt der zugehörigen Puffer wurden von der Firma Fermentas bezogen.

Für Klonierungen werden 5 µg DNA mit 50 units Restriktionsendonuklease in 50-100 µl Volumen verdaut, während es für analytische Zwecke nur 0,3 µg DNA mit 10 units Restriktionsendonuklease in 20 µl Volumen sind. Der Verdau erfolgt bei 37 °C für etwa 60 min. In jedem Fall ist dem Ansatz ein auf die verwendete Restriktionsendonuklease abgestimmter Puffer hinzuzufügen. Wird mit mehreren Restriktionsendonukleasen verdaut, so muss überprüft werden, ob sie in identischem Puffer aktiv sind. Wenn nicht, so müssen die Restriktionsendonukleasen nacheinander eingesetzt werden, wobei mit derjenigen begonnen wird, die bei der niedrigsten Salzkonzentration aktiv ist. Der Verdau kann entweder durch Hitze (5 min bei 65 °C) oder durch Zugabe von 6x Ladepuffer (Fermentas) + 0,1 % SDS gestoppt werden. Die geschnittene DNA wird auf ein TAE-Agarose-Gel aufgetragen und die entstandenen Fragmente werden mittels Gelelektrophorese voneinander getrennt (vgl. 2.4.6.).

2.2.8. Isolierung von DNA Fragmenten aus einem TAE-Agarose-Gel

Sollen bestimmte Fragmente für eine Klonierung eingesetzt werden, so werden sie aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem JETsorb Gel Extraction Kit / 300 (Genomed) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die Methode beruht auf dem Lösen des Agarose-Gels und der Bindung der DNA Fragmente an Glasmilch. An diese gebunden wird die DNA mehrmals gewaschen und schließlich mit Wasser oder TE-Puffer (vgl. 2.2.6.1.) eluiert.

2.2.9. Klonierung

Die Klonierung von PCR Produkten erfolgt in den geöffneten pGEM[®]-T-Easy Vektor (pGEM[®]-T-Easy Vector System I, Promega) mit überhängenden Thyminen. Dabei wird die Tatsache ausgenutzt, dass verschiedene Polymerasen während der PCR überhängende Enden generieren, die ein einzelnes Adenin umfassen. Der pGEM[®]-T-Easy Vektor trägt ein Gen, das Ampicillin-Resistenz vermittelt, so dass dieses Antibiotikum als Selektionsmarker eingesetzt werden kann. Die Determination von Bakterienklonen, die den Vektor mitsamt Insert enthalten, wird über die sogenannte Blau-Weiß-Detektion erleichtert. Sie beruht darauf, dass die Insertionsstelle im lacZ Gen liegt, das für das Enzym β -Galactosidase codiert. Findet keine Insertion statt, sondern eine Religation des Vektors, so wird β -Galactosidase unter Zugabe von IPTG exprimiert und das Substrat X-Gal zu Galactose hydrolysiert, wobei 5-Brom-4-chlor-indoxyl entsteht, das unter Einwirkung von Sauerstoff aus der Luft zu dem blauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo oxidiert wird. Blau gefärbte Klone enthalten das Plasmid also ohne Insert, während weiße Klone in der Regel ein Insert enthalten.

Die Klonierung von cDNAs in Expressionsvektoren erfolgte stets nach Sequenzierung im pGEM[®]-T-Easy Vektor. Die zur Klonierung verwendeten Restriktionsenzyme stammen von der Firma Fermentas.

Die Ligation findet über Nacht bei Raumtemperatur in einem Volumen von 10 μ l statt. Am nächsten Tag werden die Ligationsansätze nach Zugabe von 15 μ l Wasser zum Ausdünnen der Salze mit 250 μ l Butanol gefällt und anschließend in 10 μ l Wasser aufgenommen, ehe sie für die Transformation von *E. coli* Bakterien eingesetzt werden (vgl. 2.2.5.).

2.3. Zellkultur

2.3.1. Kulturmedien und Lösungen

Als Basismedien werden DMEM, Ham F12, McCoy's 5A, MEM und RPMI 1640 verwendet. Diesen werden 10-20 % hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (*fetal bovine serum* - FBS) zugesetzt, um die Medien unter anderem mit Cytokinen, Anheftungsfaktoren und weiteren Nährstoffen anzureichern. Die Medien einiger Zelllinien erhalten weitere Zusätze wie L-

Glutamin, nicht essentielle Aminosäuren (NEAS), Natriumpyruvat und/ oder die Antibiotika Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep). Um Kreuzkontaminationen zu vermeiden, wird für jede Zelllinie eine eigene Flasche mit Medium angesetzt.

Tab. 2.4: Übersicht über die Zellkulturmedien.

Aufgeführt ist die Zusammensetzung der im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Zellkulturmedien.

Nr.	Zellkulturmedium
1	DMEM + 10 % FBS
2	DMEM + 20 % FBS
3	DMEM/ Ham F12 + 20 % FBS
4	Mc Coy's 5A + 10 % FBS + 2 mM L-Glutamin
5	MEM + 10 % FBS + 2 mM L-Glutamin + 1 mM Natrium-Pyruvat
6	MEM + 10 % FBS + Pen/Strep
7	MEM + 20 % FBS
8	RPMI 1640 + 10 % FBS
9	RPMI 1640 + 15 % FBS
10	RPMI 1640 + 20 % FBS
11	RPMI 1640 + 10 % FBS + 2 mM L-Glutamin
12	RPMI 1640 + 20 % FBS + 2 mM L-Glutamin
13	RPMI 1640 + 10 % FBS + 2 mM L-Glutamin + NEAS
14	RPMI 1640 + 20 % FBS + 2 mM L-Glutamin + NEAS
15	RPMI 1640 + 10 % FBS + 1 mM Natrium-Pyruvat + NEAS + 10 µg/ml humanes Insulin
16	RPMI 1640/ DMEM + 20 % FBS
17	RPMI 1640/ MEM + 20 % FBS + 2 mM L-Glutamin + 1 mM Natrium-Pyruvat

Zum Waschen der Zellen sowie zum Resuspendieren von Zellpellets wird PBS verwendet.

PBS: 8,0 g/l NaCl
 0,2 g/l KCl
 1,44 g/l Na₂HPO₄·2H₂O
 0,2 g/l KH₂PO₄

Das PBS wird auf pH 7,2 eingestellt und autoklaviert.

2.3.2. Zelllinien

Bei sämtlichen verwendeten Zelllinien handelt es sich um immortalisierte Sekundärkulturen, die von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweig, stammen. Ausnahmen stellen die Primärkultur MRC-5 sowie die Sekundärkultur FE-PD dar, die beide von W.G. Dirks zur Verfügung gestellt wurden. Alle verwendeten Zelllinien sind in Tabelle 2.5 aufgeführt.

Tab. 2.5: Übersicht über die Zelllinien.

Aufgeführt sind die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten humanen Zelllinien unter Angabe der DSMZ ACC Nummern und der Tumore, aus denen die Linien etabliert wurden. Darüber hinaus sind die zur Kultivierung verwendeten Medien (vgl. Tab. 2.4), der Status in Bezug auf die Mikrosatelliten gemäß BAT26-Analyse sowie die Art der Verwendung angegeben. MSI Mikrosatelliten Instabilität; MSS Mikrosatelliten Stabilität; S Screening (Transkript- und Proteinanalyse); P Untersuchung des MSH3 Polymorphismus; K Klonierung; T Transfektion.

ACC	Zelllinie	Beschreibung	Medium	Status	Verwendung	
7	CML-T1	T-Zell-Leukämie	8	MSI	S	P
36	MOLT-17	T-Zell-Leukämie	8	MSI	S	P
40	CTV-1	Akute myeloische Leukämie	10	MSI	S	P
57	HELA	Gebärmutterhalskarzinom	8	MSS		P
83	DG-75	Burkitt-Lymphom	11	MSI	S	P
102	MV-4;11	Akute monozytische Leukämie	8	MSS		K
105	KARPAS-45	T-Zell-Leukämie	10	MSI	S	P
115	MCF-7	Brustadenokarzinom	15	MSS		P
128	NALM-6	Precursor B-Zell Leukämie	8	MSI	S	P
131	NALM-1	Precursor B-Zell Leukämie	10	MSI	S	P
140	SUP-T1	T-Zell-Lymphom	8	MSI	S	P
163	NCI-H929	Multiples Myelom	12	MSI	S	P
189	LN-405	Astrozytom	1	MSI	S	P
191	EFO-27	Eierstock Adenokarzinom	14	MSI	S	P
198	COLO-704	Eierstock Adenokarzinom	8	MSI	S	P
201	23132/87	Magenadenokarzinom	8	MSI	S	P
240	CCRF-CEM	T-Zell-Leukämie	8	MSI	S	P
256	LNCAP	Prostatakarzinom	10	MSI	S	P
261	DU-145	Prostatakarzinom	8	MSI	S	P
267	AN3-CA	Gebärmutterschleimhaut Adenokarzinom	5	MSI	S	P
278	DLD-1	Kolonadenokarzinom	8	MSI	S	P
282	JURKAT	T-Zell-Leukämie	11	MSI	S	P
305	293	Embryonale Niere	1	MSS		T
307	DV-90	Lungenadenokarzinom	13	MSI	S	P
315	HT-1080	Fibrosarkom	1	MSS		T
338	DEL	Maligne Histiozytose	8	MSS		P
350	LOVO	Kolonadenokarzinom	8	MSI	S	P
354	MHH-PREB-1	B-Zell-Lymphom	8	MSI	S	P
356	SU-DHL-1	Anaplastisches großzelliges Lymphom	8	MSS		P
357	HCT-15	Kolonadenokarzinom	8	MSI	S	P
361	BFTC-905	Harnblasenkarzinom	2	MSI	S	P
399	TANOUE	B-Zell-Leukämie	8	MSI	S	P
403	MT-3	Brustkarzinom	17	MSI	S	P
413	639-V	Harnleiterkarzinom	1	MSI	S	P
419	MFE-296	Gebärmutterschleimhaut Adenokarzinom	13	MSI	S	P
423	MFE-319	Gebärmutterschleimhaut Adenokarzinom	8	MSI	S	P
435	HSB-2	T-Zell-Leukämie	8	MSI	S	P
438	22RV1	Prostatakarzinom	16	MSI	S	P
439	CAL-72	Osteosarkom	8	MSI	S	P
483	HPB-ALL	T-Zell-Leukämie	10	MSI	S	P
491	RH-18	Rhabdomyosarkom	10	MSI	S	P
496	HCC-15	Nichtkleinzelliges Lungenkarzinom	8	MSI	S	P
506	H-1339	Kleinzelliges Lungenkarzinom	10	MSI	S	P
508	RS4;11	Precursor B-Zell Leukämie	8	MSI	S	P
509	SUP-M2	Anaplastisches großzelliges Lymphom	8	MSS		P
519	KCL-22	Chronische myeloische Leukämie in der Blastenkrise	1	MSI	S	P
520	CL-34	Kolonkarzinom	3	MSI	S	P
525	DND-41	T-Zell-Leukämie	8	MSI	S	P
530	L-1236	Hodgkin-Lymphom+	8	MSS		K
540	H-1963	Kleinzelliges Lungenkarzinom	16	MSI	S	P
578	TOM-1	Precursor B-Zell Leukämie	10	MSS		P
579	NU-DUL-1	B-Zell-Lymphom	9	MSS		P
580	HTC-C3	Schilddrüsenkarzinom	7	MSS		P
581	HCT-116	Kolonkarzinom	4	MSI		T
582	OCI-AML-3	Akute myeloische Leukämie	7	MSS		P
583	NU-DHL-1	B-Zell-Lymphom	9	MSS		P
584	REC-1	B-Zell-Lymphom	8	MSS		P

589	JIMT-1	Brustkarzinom	1	MSS	P	
591	MOLM-20	Chronische neutrophile Leukämie	10	MSS	P	
592	RH-41	Rhabdomyosarkom	8	MSS	P	
602	L-591	Lymphoblastoide B-Zelle (Hodgkin-Lymphom)	10	MSS		K
-	FE-PD	Anaplastisch großzelliges Lymphom vom T-Zell-Typ	8	MSS	P	K
-	MRC-5	gesunde Vorhautzellen	6	MSS	S	

2.3.3. Kulturbedingungen

Je nach Linie werden die Zellen in Gewebekulturplatten mit 24, 12 oder 6 Näpfen bzw. in Gewebekulturflaschen von 25 cm², 80 cm² oder 175 cm² Bodenfläche kultiviert. Die Inkubation erfolgt bei 37 °C und einer CO₂-Konzentration von 5-10 %. Die Schraubverschlüsse der Kulturflaschen bleiben leicht geöffnet, damit ein Gasaustausch stattfinden kann. Da eine Zelllinie über längere Kultivierungszeiträume genomische Veränderungen erfahren kann, werden diese Zeiträume auf maximal 2 Monate begrenzt.

Für das *live-cell imaging* (vgl. 2.6.) werden die Kulturschalen mit Poly-L-Lysin vorbehandelt (10 µg/ml, 1-24 Stunden bei RT inkubieren).

2.3.4. Passagieren von Monolayerkulturen

Strikt adhärente Zelllinien stellen ihr Wachstum ein, sobald sie die ihnen im Kulturgefäß zur Verfügung stehende Fläche vollständig eingenommen haben, also konfluent sind. Tumorzellen können zwar weiter wachsen, jedoch benötigen sie dann viel Medium und weisen eine verringerte Proliferationsrate auf. Deshalb werden adhärente Zelllinien am besten vor Erreichen der Konfluenz abgelöst, verdünnt und erneut ausgesät.

Das Ablösen der adhärennten Zellen erfolgt mithilfe des proteolytischen Enzyms Trypsin. Da dessen Wirkung durch serumhaltiges Medium stark beeinträchtigt wird, werden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen. Anschließend werden sie mit Trypsin überschichtet. Nach mehrminütiger Inkubation werden die Zellen vom Boden des Kulturgefäßes abgeschlagen und durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Der Trypsinisierungsprozess wird durch Zugabe von Medium mit FBS beendet und die Zellen werden direkt ausgesät.

Die Zelllinie 293 reagiert sehr empfindlich auf Trypsin, weshalb sie mit TEN abgelöst wird. Sobald die Zellen vereinzelt sind, wird Kulturmedium zugegeben. Anschließend werden die Zellen pelletiert und in frischem Medium ausgesät.

TEN: 40 mM Tris/HCl; pH 7,5
 1 mM EDTA; pH 8,0
 150 mM NaCl

Das TEN wird autoklaviert.

2.3.5. Passagieren von Suspensionskulturen

Auch Suspensionskulturen müssen regelmäßig verdünnt werden, damit der Verbrauch an Medium nicht zu hoch ist. Zum Verdünnen kann man einfach frisches Medium zugeben. Die Zellen können auch zunächst pelletiert und anschließend in frischem Medium resuspendiert werden. Um altes Medium und Reste abgestorbener Zellen zu entfernen, kann man die Suspension aufwirbeln, wieder sedimentieren lassen und den Überstand vorsichtig abziehen, sobald die schnell sinkenden, viablen Zellen den Boden erreicht haben. Dazu sollte ein hohes Gefäß mit möglichst kleiner Grundfläche verwendet werden.

2.3.6. Einfrieren und Auftauen der Zellen

Die längerfristige Lagerung von Zelllinien findet bei -196 °C in flüssigem Stickstoff statt. Um die Kristallbildung sowie die partielle Dehydratation des Cytoplasmas zu verhindern, enthält das Einfriermedium neben 70 % Basismedium und 20 % FBS 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO). $1 \cdot 10^6$ Zellen werden pelletiert, in 1 ml des Einfriermediums resuspendiert und in Kryoröhrchen gegeben. Diese Röhrchen werden in Kryoboxen langsam auf -80 °C heruntergekühlt und nach ca. 24 Stunden in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen werden die Zellen im 37 °C Wasserbad erwärmt und zum schnellen Ausdünnen des toxischen DMSO direkt in das zehnfache Volumen Kulturmedium gegeben. Um das DMSO vollständig zu entfernen werden die Zellen pelletiert und in frischem Kulturmedium resuspendiert. Es folgt die Aussaat in adäquate Gewebekulturgefäße (vgl. 2.3.3.).

2.3.7. Bestimmung von Zellzahl und Viabilität

Zur Bestimmung der Viabilität von Zellen hat sich der einfache und schnelle Trypanblaufärbetest bewährt. Er beruht darauf, dass der Farbstoff Trypanblau tote Zellen anfärbt, während er in lebende Zellen nicht eindringen kann. Das Trypanblau wird 1:1 mit

einer homogenen Zellsuspension gemischt. Nach kurzer Inkubation wird der Testansatz in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und die Anzahl lebender und toter Zellen ermittelt. Die Zellzahl pro Milliliter der untersuchten Zellsuspension ergibt sich aus der Zahl lebender Zellen in einem der neun großen Quadrate multipliziert mit $2 \cdot 10^4$.

Der relative Anteil lebender Zellen, die so genannte Viabilität, errechnet sich wie folgt:

Viabilität [%] = lebende Zellen / (lebende Zellen + tote Zellen) * 100.

2.3.8. Stabile Transfektion humaner Zelllinien

Die Transfektion humaner Zelllinien erfolgte mit dem SuperFect[®] Transfection Reagent von Qiagen. Das Prinzip der Transfektion mit diesem Reagenz beruht darauf, dass Liposomen gebildet werden, die die zu transfizierende DNA einschließen. Über die Fusion dieser Liposomen mit der Zellmembran gelangt die DNA in das Zellinnere.

Die stabile Transfektion wurde mit 293, DLD-1, HCT-116, HT-1080 und LOVO Zellen durchgeführt. Von diesen Linien werden jeweils $0,05 \cdot 10^6$ (DLD-1), $0,1 \cdot 10^6$ (HCT-116 und LOVO) bzw. $0,2 \cdot 10^6$ (293 und HT-1080) Zellen in eine Gewebekulturschale von 10 cm Durchmesser ausgesät. Einen Tag später wird am Morgen das Medium gewechselt. Dabei wird dem frischen Medium Penicillin/ Streptomycin (Pen/Strep) zugesetzt, um Kontaminationen vorzubeugen, die durch das Einbringen von Plasmid-DNA in die Zellkultur hervorgerufen werden könnten. Nach 4 Stunden werden jeweils 5 µg DNA in die Zellen transfiziert. Dazu wird die DNA mit Basismedium auf ein Gesamtvolumen von 130 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 25 µl SuperFect[®] Transfection Reagent (Qiagen) wird der Ansatz sofort gründlich gevortext und anschließend 10 min bei RT inkubiert. Dann wird der Ansatz mit FBS- und Pen/Strep-haltigem Medium auf 1 ml Gesamtvolumen aufgefüllt, gemischt und zu den Zellen gegeben. Am Tag darauf wird mit der Selektion begonnen, indem dem Medium für die transfizierten Zellen Puromycin zugesetzt wird (0,4 µg/ml für HCT-116 und HT-1080; 0,6 µg/ml für LOVO; 0,8 µg/ml für 293 und DLD-1).

Nach etwa 14 Tagen sind mit dem bloßen Auge Kolonien von Zellen sichtbar, die auf eine einzelne transfizierte Zelle zurückzuführen sind und damit einen Einzelklon darstellen. Die Einzelklone werden mit einer 1000 µl Pipette aufgenommen und in eine 96-Well-Platte umgesetzt. Sobald die Zellen adhärent sind und wachsen, wird die Hälfte der Zellen auf eine zweite 96-Well-Platte umgesetzt, die eine exakte Kopie der ersten darstellt. Es wird

wieder abgewartet bis die Zellen adhären sind. Dann wird aus einer der beiden Platten das Medium abgeschlagen, die Platte wird auf den Kopf gedreht und die Zellen werden durch den Kunststoff hindurch an dem Labophot Fluoreszenzmikroskop von Nikon mit dem 20er Objektiv auf Fluoreszenz hin untersucht. Dabei wird zur Detektion von GFP und YFP der B-2A Filter verwendet und zur Detektion von CFP der UV-2A Filter. Von den verschiedenen Einzelklonen eines Transfektionsansatzes werden die beiden mit der stärksten Fluoreszenzintensität ausgewählt, weiter kultiviert, expandiert und schließlich als Reserve in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bei sämtlichen Arbeiten mit den transfizierten Einzelklonen wird der Selektionsdruck aufrechterhalten.

2.3.9. Zellzyklussynchronisation

Zur Untersuchung zellzyklusabhängiger Regulationsprozesse können Zellen mit verschiedenen Methoden synchronisiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden die beiden Drogen Colcemid und Aphidicolin zur Synchronisation der HT-1080 Zellen eingesetzt. Colcemid führt zur Depolymerisierung von Mikrotubuli und hemmt deren Neubildung. Dadurch wird vor allem der Aufbau des Spindelapparates gehemmt, weshalb Colcemid einen Zellzyklusarrest in der G2/M Phase auslöst. Aphidicolin hemmt die Polymerasen α und δ und damit die Replikation, woraus ein Zellzyklusarrest in der G1/S Phase resultiert. Zunächst werden die Zellen für 14 Stunden mit 20 ng/ml Colcemid behandelt, so dass ein Zellzyklusarrest in der G2/M Phase erfolgt. In dieser Phase sind die Zellen nur sehr schwach am Boden des Kulturgefäßes angeheftet, so dass sie leicht abgeschlagen werden können (*mitotic shake-off*). Die mitotischen Zellen werden in ein neues Kulturgefäß umgesetzt, in dem sie während der folgenden 10 Stunden die Mitose beenden und in die G1 Phase übergehen können. Dann werden sie für weitere 14 Stunden mit 2 μ g/ml Aphidicolin behandelt, so dass ein weiterer Zellzyklusarrest am Übergang G1/S erfolgt. Nach dem Auswaschen des Aphidicolins mit DMEM werden die Zellen mit Kulturmedium überschichtet und durchlaufen die S-Phase.

2.3.10. Fluoreszenzaktivierte Zellanalyse (*fluorescence activated cell sorting* - FACS)

Der Erfolg der Zellsynchronisation wird mithilfe der FACS Analyse überprüft. Bei dieser Methode werden die Zellen mit der in die DNA interkalierenden und fluoreszierenden Substanz Propidiumiodid behandelt. Anschließend wird die Fluoreszenz jeder einzelnen Zelle in einem Durchflusszytometer bestimmt. Während die Zelle an dem Detektor vorbeifließt, misst dieser einerseits die Fluoreszenzintensität und andererseits die Größe des fluoreszierenden Zellkerns. Da sich der DNA Gehalt im Verlauf des Zellzyklus verdoppelt und wieder halbiert und sich auch die Größe des Zellkerns verändert, kann so auf die Zellzyklusphase geschlossen werden, in der sich eine einzelne Zelle befindet. Für die FACS Analyse werden $1 \cdot 10^6$ Zellen 4 min bei 1000 rpm (Centrifuge 5804, Eppendorf) pelletiert, in PBS gewaschen und schließlich in 2 ml 70 % Ethanol aufgenommen. Es folgt eine 20minütige Inkubation auf Eis. Alternativ können die Proben so auch mehrere Tage bei 4 °C gelagert werden. Nun werden die Zellen 5 min bei 15 °C und 1250 rpm (Kühlzentrifuge Allegra X-15R Centrifuge, BeckmanCoulter) zentrifugiert. Das Pellet wird in 2 ml PBS gewaschen und es folgt ein weiterer Zentrifugationsschritt von 5 min bei 15 °C und 1250 rpm, nach dem der Überstand verworfen wird. Die Zellen werden in 90 µl PBS resuspendiert. Anschließend werden 10 µl RNase (1 mg/ml) zugegeben. Dies ist notwendig, da Propidiumiodid auch in die RNA interkalieren würde und das Messergebnis so nicht auswertbar wäre. Der RNA Verdau erfolgt über 15 min bei 37 °C. Anschließend werden die Zellen mit 2 ml PBS gewaschen, pelletiert und in 500 µl PBS resuspendiert. Es werden 20 µl Propidiumiodid (0,2 mg/ml) zugegeben und nach einer 10minütigen Inkubation auf Eis erfolgt die Messung am Durchflusszytometer.

2.4. Biochemische Methoden

2.4.1. DNA-Isolierung aus humanen Zellen

Die Isolierung genomischer DNA aus humanen Zelllinien erfolgte mit dem High Pure PCR Template Preparation Kit von Roche nach Angaben des Herstellers. Dabei werden die Zellen zunächst in Anwesenheit von Proteinase K und dem chaotropen Salz Guanidinium-HCl lysiert. Anschließend binden die Nukleinsäuren an einen Filter und werden über verschiedene Waschschrte von Salzen, Proteinen und weiteren Verunreinigungen befreit. Nach der Eluierung der aufgereinigten Nukleinsäuren stehen diese für verschiedene Anwendungen wie beispielsweise die PCR zur Verfügung.

2.4.2. RNA-Isolierung aus humanen Zellen

Für die Isolierung von RNA werden $5 \cdot 10^6$ Zellen 4 min bei 1000 rpm pelletiert (Centrifuge 5804, Eppendorf) und gründlich in PBS gewaschen. Die Zellen werden erneut zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml Trizol (Invitrogen) resuspendiert. Nach einer 5minütigen Inkubation bei RT werden 200 µl Chloroform dazugegeben und der Ansatz geschüttelt. Auf eine 3minütige Inkubation bei RT folgt ein Zentrifugationsschritt von 15 min bei 4°C und 12000 rpm (Kühlzentrifuge 3K30, Sigma). Dabei bilden sich zwei Phasen, wobei die RNA in der oberen Phase vorliegt, während die untere Phase DNA und Proteine enthält. Die obere Phase wird vorsichtig abgenommen und zur Fällung der RNA mit 500 µl Isopropanol vermischt und anschließend für 10 min bei RT inkubiert. Der Ansatz wird 15 min bei 4 °C und 12000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet getrocknet. Die RNA wird mit 70 % Ethanol gewaschen, 5 min bei 4 °C und 12000 rpm abzentrifugiert und anschließend getrocknet. Schließlich wird das Pellet in 100 µl deionisiertem Wasser gelöst. Insgesamt 12 µl werden für ein Kontrollgel und die Quantifizierung am Photometer abgenommen. Zu der übrigen RNA Lösung werden 10 µl 4 M LiCl (pH 5) und 300 µl 100 % Ethanol gegeben. So kann die RNA bei -20 °C mehrere Monate gelagert werden. Die RNA Isolierung mit Trizol basiert auf der von Chomczynski & Sacchi (1987) beschriebenen *single-step method* zur RNA-Isolierung.

2.4.3. Überprüfung der Quantität und Qualität von isolierten Nukleinsäuren

Die Quantifizierung von isolierter DNA und RNA erfolgte über die Messung der optischen Dichte bei 260 nm (OD_{260}) mit dem Photometer Genesys 10 UV (Thermo Spectronic).

Die Nukleinsäure-Konzentration wird wie folgt berechnet:

$$\text{dsDNA-Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = OD_{260} * 50$$

$$\text{RNA-Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = OD_{260} * 40$$

Bei der Messung ist darauf zu achten, dass der Wert für die OD_{260} zwischen 0,05 und 1 liegt, da die Messwerte nur in diesem Bereich zuverlässig sind. Die zu messenden Nukleinsäuren müssen also entsprechend verdünnt werden, wobei für die Messung von DNA in der Regel eine 1:1000 Verdünnung und für die Messung von RNA in der Regel eine 1:100 Verdünnung entsprechende Ergebnisse liefert. Selbstverständlich muss der Verdünnungsfaktor bei der Bestimmung der tatsächlichen Konzentration mit berücksichtigt werden. Über die gleichzeitige Messung der optischen Dichte bei 280 nm (OD_{280}) kann eine Aussage über den Grad möglicher Proteinkontaminationen getroffen werden, indem das Verhältnis OD_{260}/OD_{280} bestimmt wird. Bei einer Nukleinsäurelösung, die frei von Proteinen ist, beträgt dieses Verhältnis 1,8-2,0.

Auch über das Auftragen der isolierten Nukleinsäuren auf ein TAE-Agarose-Gel können deren Konzentration und Qualität abgeschätzt werden. Die Verwendung definierter Mengen der Größenstandards GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus (Fermentas) und 1Kb DNA Ladder (Invitrogen) erlaubt anhand eines Vergleichs der Signalstärken von zu quantifizierender Nukleinsäure mit einer Bande entsprechender Größe eines der beiden Größenstandards Rückschlüsse auf die Konzentration der eingesetzten Lösung. Darüber hinaus kann festgestellt werden, ob die Nukleinsäure partiell degradiert ist oder Kontaminationen mit anderen Nukleinsäuren aufweist.

2.4.4. cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgt unter Verwendung der SuperScript™ II Reverse Transcriptase von Invitrogen. Es werden 5 µg der in Ethanol gelagerten RNA (vgl. 2.4.2.) 20 min bei 4 °C und 12000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet mit 75 % eiskaltem Ethanol gewaschen. Die RNA wird erneut 5 min bei 4 °C und 12000 rpm

zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet bei RT getrocknet. Nach Zugabe von 11 µl deionisiertem Wasser und 1 µl Random Primern (50 µg/ml; Invitrogen) wird der Ansatz 10 min bei 70 °C inkubiert und anschließend 2 min auf Eis abgekühlt. Dann werden 4 µl 5x First-Strand Buffer (Invitrogen), 1 µl 0,1 M DTT (Invitrogen) und 1 µl 10 mM dNTPs (peqGOLD dNTP-Set 'Long Range' von Peqlab Biotechnologie GmbH) zupipettiert und der Ansatz 2 min lang auf 42 °C erwärmt. Je Ansatz wird 1 µl Reverse Transkriptase hinzugefügt. Nach einer Inkubation von 50 min bei 42 °C wird die Reaktion durch 3minütiges Erhitzen auf 75 °C gestoppt. Die cDNAs werden umgehend für die RT-PCRs eingesetzt oder bei -20 °C gelagert.

2.4.5. Polymerase Kettenreaktion (*polymerase chain reaction* - PCR)

Die PCR dient der Amplifikation spezifischer DNA Fragmente. Grundsätzlich besteht sie aus den drei Schritten Denaturierung, Annealing und Elongation. Bei der Denaturierung werden die DNA Einzelstränge voneinander getrennt, beim Annealing binden 20-30 Nukleotide lange Oligos an spezifischen Sequenzen auf beiden Einzelsträngen und ermöglichen so die von der Polymerase durchgeführte Elongation jeweils in 5'-3' Richtung. Dieser Zyklus wird 35 mal wiederholt. Werden mit der PCR cDNA Sequenzen amplifiziert, wie es in der vorliegenden Arbeit hauptsächlich der Fall war, so spricht man von Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR). Die Durchführung der einzelnen RT-PCRs erfolgt nach den folgenden beiden Protokollen:

Protokoll 1:	Wasser (deionisiert)	17,5 µl
	10x PCR Puffer (Takara)	2,5 µl
	dNTPs (jeweils 2,5 mM; Takara)	1,0 µl
	Vorwärts-Primer (10 µM)	1,0 µl
	Rückwärts-Primer (10 µM)	1,0 µl
	Polymerase (5 units/µl; TaKaRa Taq™ Hot Start Version)	0,2 µl
	Template	2,0 µl

Programm 1:

Zyklus	Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Bemerkungen
1 (1x)	1	95	03:00	
2 (35x)	1	94	00:04	
	2	vgl. Tab. 2.6	00:30	
	3	72	01:30	[1]
3 (1x)	1	72	10:00	
4 (1x)	1	20	∞	

[1] Erhöhung der Dauer des Annealings nach jedem Zyklus um 2 sec

Protokoll 2:	Wasser (deionisiert)	3,5 µl
	10x PCR Puffer (Qiagen)	1,5 µl
	dNTPs (jeweils 2,5 mM; Takara)	1,0 µl
	Vorwärts-Primer (10 µM)	1,0 µl
	Rückwärts-Primer (10 µM)	1,0 µl
	Template	2,0 µl
	5x Q-Solution (Qiagen)	5,0 µl
	Qiagen-Mix	10,0 µl

Qiagen-Mix:

Wasser (deionisiert)	8,75 µl
10x PCR Puffer (Qiagen)	1,0 µl
Polymerase (5 units/µl; Taq DNA Polymerase von Qiagen)	0,25 µl

Programm 2:

Zyklus	Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Bemerkungen
1 (1x)	1	95	05:00	
	2	72	03:00	[1]
	3	vgl. Tab. 2.6	02:00	
	4	72	10:00	
2 (35x)	1	94	00:30	
	2	vgl. Tab. 2.6	00:30	
	3	72	01:00	[2]
3 (1x)	1	72	10:00	
4 (1x)	1	20	∞	

[1] Zugabe des Qiagen-Mix

[2] Erhöhung der Dauer des Annealings nach jedem Zyklus um 2 sec

Die für die verschiedenen RT-PCRs eingesetzten Primer sind in Tabelle 2.6 aufgeführt.

Tab. 2.6: Übersicht über die im Rahmen der RT-PCRs verwendeten Primer.

Aufgeführt sind die Primer, die für die zur Transkriptanalyse und Klonierung durchgeführten RT-PCRs verwendet wurden. Darüber hinaus sind die jeweilige Annealing-Temperatur, das Protokoll (vgl. Text), die Fragmentgröße gemäß Datenbanksequenz (NM_000251.1 für MSH2, NM_002439.2 für MSH3 und NM_000179.1 für MSH6) sowie der Zweck der RT-PCR angegeben. Bei den für die Klonierungen verwendeten Primern grau unterlegten Sequenzen handelt es sich um die überhängenden Enden (vgl. 3.3.1.).

Primername	Sequenz 5'→3'	Annealing [°C] (Protokoll)	Fragment- größe [bp]	Zweck
MSH2-A-F	ATG GCG GTG CAG CCG AAG	57 (2)	979	Transkript-Analyse
MSH2-A-R	CCA GAG ACT GAG AGC CAG TGG			
MSH2-B-F	CTG CCT TGC TGA ATA AGT GTA AAA CC	60 (1)	1089	Transkript-Analyse
MSH2-B-R	TGG GCC ATG AGT ACT ATC ACC C			
MSH2-C-F	AAT TGG GTG TTT TGT GCC ATG TGA G	60 (1)	735	Transkript-Analyse
MSH2-C-R	TCA CGT AGT AAC TTT TAT TCG TGA AAT G			
MSH3-A.2-F	CAG AAA TTG ACA GAA GAA AGA AGA GAC C	60 (1)	868	Transkript-Analyse
MSH3-A-R	CAC AGA AGA TAG CTG GTA GAA GTA TCA			
MSH3-B-F	TCT CTG AAA ATA AGG AAA ATG TTA GGG AC	60 (1)	1115	Transkript-Analyse
MSH3-B-R	GTG CAG AAG GAT TTT TTA GTA TTT TTC G			
MSH3-C-F	ATG TGA CAG TAT CAG GAC AGG AGT TTA TG	60 (1)	1186	Transkript-Analyse
MSH3-C-R	TTA ATG AAG AAG AGA AGT CTG TGT TTC TTC			
MSH6-A-F	GGC CTT GCC GGC TGT C	60 (1/2)	777	Transkript-Analyse
MSH6-A-R	TCT GAT ATG ACC CTT CGT TTT TTT ATT			
MSH6-B-F	TAG CCG CCA AAT AAA AAA ACG A	60 (1)	894	Transkript-Analyse
MSH6-B-R	AGA TAC TTA CTG TAG TTC TCA GAG GGA TCA			
MSH6-C-F	GTG ATC CCT CTG AGA ACT ACA GTA AGT ATC	60 (1)	836	Transkript-Analyse
MSH6-C-R	TTC GGA GAT TTT GTC AGG CAC			
MSH6-D-F	GCC TGA CAA AAT CTC CGA AGT T	60 (1)	898	Transkript-Analyse
MSH6-D-R	CGT AAT GCA AGG ATG GCG T			
MSH6-E-F	TGC ATT ACG AAG ACT TTT TTT GGA G	65 (1)	823	Transkript-Analyse
MSH6-E-R	AAG TCA ACT CAA AGC TTC CAA TGT AGT			
ABL-F	TGA CTT TGA GCC TCA GGG TCT GAG TGA AGC C	60 (1)	216	Kontrolle
ABL-R	CCA TTT TTG GTT TGG GCT TCA CAC CAT TCC			
MSH2-MluI-F	ACG CGT ATG GCG GTG CAG CCG AAG G	60 (1)	1117	Klonierung
MSH2-H3-R	CTG CAT CTT CTA CAA AAG CTT CCA C			
MSH2-H3-F	GTG GAA GCT TTT GTA GAA GAT GCA G	60 (1)	1725	Klonierung
MSH2-ApaI-R	GGG CCC TCA CGT AGT AAC TTT TAT TCG TGA AAT G			
MSH3-F	ACG CGT ATG TCT CGC CGG AAG CCT GC	60 (1)	2415	Klonierung
MSH3-Xba-R	CTC TAG AAA ATC AAG CCA TTC AGC AC			
MSH3-Xba-F	TTC TAG AGA AAT TCA GTG AAC ATT A	60 (1)	992	Klonierung
MSH3-R	ACT AGT TTA ATG AAG AAG AGA AGT CTG TGT			
MSH6-F	ACG CGT ATG TCG CGA CAG AGC ACC CTG TA	60 (1)	2400	Klonierung
MSH6-Xba-R	GAG GTC TTC TAT GGC ATC TAG ACG ATC			
MSH6-Xba-F	GTC TAG ATG CCA TAG AAG AC	60 (1)	1718	Klonierung
MSH6-R	ACT AGT CTA TAA TTC CTT AAT CAA AGT CAG			
MSH6-F-Ex2	ACG CGT ATG GAG GGT TAC CCC TGG TGG CCT	60 (1)	2103	Klonierung
MSH6-Xba-R	GAG GTC TTC TAT GGC ATC TAG ACG ATC			

Die PCR-Produkte werden mittels Agarose-Gelelektrophorese charakterisiert (vgl. 2.4.6.).

Zur Untersuchung des Fragments MSH3-A.1 und des MSH3 Polymorphismus wurden PCRs von cDNA und genomischer DNA durchgeführt, wobei der jeweilige Vorwärts-Primer mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert war. Dies ermöglichte eine sehr genaue Größenbestimmung der Amplikons mittels Kapillarelektrophorese (vgl. 2.4.7.). Die zu diesem Zweck verwendeten Primer sind in Tabelle 2.7 aufgeführt.

Tab. 2.7: Übersicht über die im Rahmen der Untersuchung des MSH3 Polymorphismus verwendeten Primer.

Aufgeführt sind die zur Bestimmung der in den verschiedenen Zelllinien vorliegenden MSH3 Allele mittels Kapillarelektrophorese verwendeten Primer unter Angabe der Annealingtemperatur, des angewendeten Protokolls (vgl. Text) sowie der gemäß Datenbanksequenz NM_002439.2 erwarteten Fragmentgrößen. Während der Rückwärts-Primer zur Analyse der genomischen DNA auf dem Exon 1 bindet, bindet der Rückwärts-Primer zur Analyse der cDNA auf dem Exon 2. Die Sequenz des Vorwärts-Primers ist für beide Analysen identisch, allerdings ist dieser Primer für die Analyse der genomischen DNA mit dem grünen Fluoreszenzfarbstoff D3 und für die Analyse der cDNA mit dem blauen Fluoreszenzfarbstoff D4 markiert.

Primername	Sequenz 5'→3'	Annealing [°C] (Protokoll)	Fragment- größe	Zweck
D3-MSH3-F	D3-ATG TCT CGC CGG AAG CCT G	60 (2)	237	Analyse von genomischer DNA
gMSH3-R	TAC GTG CGG CGG CAG C			
D4-MSH3-F	D4-ATG TCT CGC CGG AAG CCT G	60 (2)	286	Analyse von cDNA
RT-MSH3	GCC CAT CAT TTT CCA ATG GTC TC			

2.4.6. Agarose-Gelelektrophorese

Abhängig von ihrer Größe und Beschaffenheit (zirkulär oder linearisiert) weisen Nukleinsäure-Moleküle im elektrischen Feld ein spezifisches Laufverhalten auf. Daher können verschiedene Nukleinsäure-Fragmente über die Agarose-Gelelektrophorese voneinander getrennt und charakterisiert werden. Dabei wird das Laufverhalten außerdem von der Agarosekonzentration, den Pufferbedingungen und der Stromstärke beeinflusst.

Die Agarose-Gelelektrophorese erfolgt in TAE-Puffer:

TAE-Puffer (50x): 242 g/l Tris/HCl; pH 7,8
 57,1 ml/l Essigsäure (100 %)
 100 ml/l EDTA; pH 8,0

Für das Agarose-Gel werden 1-3 % Agarose unter Aufkochen in TAE-Puffer gelöst und auf ca. 60 °C abgekühlt. Dann wird Ethidiumbromid zupipettiert, so dass die Endkonzentration 0,5 µg/ml beträgt, und das Gel wird gegossen. In das noch flüssige Gel wird ein Kamm gesteckt, wodurch beim Festwerden des Gels die Taschen entstehen, in die die Proben nach Zugabe von 6x Ladepuffer (Fermentas) schließlich einpipettiert werden. Zur Charakterisierung von Nukleinsäuren werden die DNA-Größenstandards GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus (Fermentas) und/ oder 1Kb DNA Ladder (Invitrogen) verwendet. Darüber hinaus wird eine Positivkontrolle mit aufgetragen, die exakt diejenigen Nukleinsäurefragmente enthält, auf deren Existenz hin die übrigen Proben überprüft werden sollen. Während der Agarose-Gelelektrophorese interkaliert das Ethidiumbromid in die Nukleinsäuren, wodurch sich einerseits sein Absorptionsspektrum verändert und andererseits die Intensität der

Emission stark zunimmt. Daher können die Nukleinsäurefragmente nach Anregung mit UV Licht über die Fluoreszenz von Ethidiumbromid detektiert werden. Die Agarose-Gelelektrophorese kann für analytische und präparative Zwecke eingesetzt werden.

2.4.7. Kapillarelektrophorese

Auch bei der Kapillarelektrophorese wird die Tatsache ausgenutzt, dass Nukleinsäurefragmente in Abhängigkeit von ihrer Größe ein unterschiedliches Laufverhalten im elektrischen Feld aufweisen. Da sich die Gelmatrix in einer Kapillare mit sehr geringem Durchmesser befindet, können hohe Spannungen angelegt werden, ohne zu einer Überhitzung zu führen. Daher können die einzelnen Fragmente über sehr lange Strecken aufgetrennt werden, woraus sich eine Genauigkeit ergibt, mit der Größenunterschiede von nur einem Nukleotid detektiert werden können. Die Detektion erfolgt über einen Fluoreszenzfarbstoff, mit dem einer der zur Amplifikation des entsprechenden Fragments verwendeten Primer markiert wird. Das Mitführen eines DNA Größenstandards ermöglicht es, die gemessenen Signale spezifischen Größen zuzuordnen.

Je zu messender Probe werden folgende Komponenten zusammenpipettiert:

- 28,5 µl SLS Sample Loading Solution (Beckman Coulter)
- 0,5 µl Größenstandard (DNA Size Standard Kit - 400; Beckman Coulter)
- 1,0 µl Template

Die Proben werden mit Mineralöl überschichtet, um das Verdampfen der Flüssigkeit zu verhindern. Die Messung erfolgt im Genetic Analysis System CEQ™ 8000 von Beckman Coulter.

2.4.8. Sequenzierung von cDNAs

Die Sequenzierung von cDNAs erfolgte nach dem Einklonieren spezifischer cDNAs in den pGEM®-T-Easy Vektor. Als Sequenzierungsprimer wurden die an den RNA Polymerase Promotoren T7 und SP6 des pGEM®-T-Easy Vektors bindenden Primer sowie die in der Tabelle 2.8 aufgeführten spezifischen Sequenzierungsprimer eingesetzt. Die Sequenzierung wurde von der Firma MWG durchgeführt.

Der Abgleich der von den cDNAs erhaltenen Sequenzen erfolgte anhand der Datenbank-Sequenzen NM_000251.1 für MSH2, NM_002439.2 für MSH3 und NM_000179.1 für MSH6 mit dem EMBOSS Programm Needle.

Tab. 2.8: Übersicht über die Sequenzierungsprimer.

Aufgeführt sind die zur Sequenzierung der in einen Vektor einklonierten und den MSH2, MSH3 bzw. MSH6 Transkripten entsprechenden cDNAs verwendeten Primer.

Primername	Sequenz 5'→3'
MSH2Seq	CAG AAT ATG AAG AAG CCC AGG ATG CC
Seq-MSH3-F	ATC ATC AAA TAC AAG TCA TG
Seq-MSH3_rev	TTC CGA TAC AGC ATC AAG CC
MSH3-A-revseq	GAC ATT CCC AGA TCA CTT CCT C
Seq-MSH6-F	TTA AGC CAG ACA CTA AGG AG
Seq-MSH6-R	GTG AAG TAT CAA CAA AGC AC
MSH6-A-revseq	CGG ACT GAT TTC CCT TTC TC

2.4.9. Bisulfit Konversion und *methylation-specific PCR* (MSP)

Um zu untersuchen, ob die Promotorsequenz von MLH1 methyliert ist, wurde eine Bisulfit Konversion mit dem MethylDetector Bisulfite Modification Kit von Active Motif nach Angaben des Herstellers durchgeführt und eine *methylation-specific PCR* (MSP) angeschlossen. Während der Bisulfit Konversion werden sämtliche unmethylierte Cytosine zu Uracil konvertiert, während die methylierten Cytosine unbeeinflusst bleiben. Wenn bereits bekannt ist, welche Cytosine im Falle einer Promotormethylierung eine Methylgruppe tragen, dann kann über *methylation-specific PCR* (MSP) direkt nachgewiesen werden, ob in einem speziellen Fall eine Methylierung vorliegt oder nicht (Herman et al. 1996). Dabei wird eine Methylierung mithilfe von Primern nachgewiesen, die nach erfolgreicher Bisulfit Konversion direkt auf den von der Methylierung betroffenen Cytosinen und gleichzeitig auf einigen Uracilen binden. Wird ein Produkt erhalten, so gelten die Methylierung und auch die erfolgreiche Konversion als bestätigt. Wenn jedoch kein Produkt erhalten wird, dann liegt entweder keine Methylierung vor oder die Bisulfit Konversion hat nicht alle unmethylierten Cytosine erreicht. Um letzteres auszuschließen, wird eine PCR mit einem zweiten Primerpaar durchgeführt, dass prinzipiell auf der gleichen Sequenz bindet wie das erste, jedoch nur dann, wenn alle Cytosine zu Uracilen konvertiert sind. Ein Produkt aus dieser PCR bestätigt, dass die Konversion an allen Cytosinen stattgefunden hat und dass keines der Cytosine methyliert

war. Die aus der Bisulfit Konversion erhaltene DNA wurde direkt für die MSP eingesetzt. Dabei wurde das folgende Protokoll verwendet.

Wasser (deionisiert)	18,8 µl
10x PCR Puffer (Takara)	3,0 µl
dNTPs (jeweils 2,5 mM; Takara)	2,0 µl
Vorwärts-Primer (10 µM)	1,0 µl
Rückwärts-Primer (10 µM)	1,0 µl
Polymerase (5 units/µl; TaKaRa Taq™ Hot Start Version)	0,2 µl
Template	4,0 µl

Als Kontrollen wurden Wasser und 40 ng unkonvertierte DNA eingesetzt. In Anlehnung an das von Capel et al. (2007) angegebene Protokoll wurde die PCR mit folgendem Programm durchgeführt.

Zyklus	Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]
1 (1x)	1	95	03:00
2 (40x)	1	95	00:30
	2	53	00:45
	3	72	00:30
3 (1x)	1	72	04:00

Die verwendeten Primer wurden von Park et al. (2003) übernommen, da Capel et al. (2007) zeigen konnten, dass eine Methylierung der Promotorsequenz von MLH1 in dem Bereich, der mit diesen Primern untersucht werden kann, zu einem Ausschalten der Expression dieses Gens führt. Die Primer sind in Tabelle 2.9 aufgelistet.

Tab. 2.9: Übersicht über die zur Durchführung der MSP verwendeten Primer.

Aufgeführt ist das Primerpaar zum Nachweis methylierter DNA sowie das Primerpaar zum Nachweis unmethylierter DNA im Bereich des MLH1 Promotors, aus dessen Methylierung ein Abschalten der MLH1 Genexpression resultiert. Angegeben sind außerdem die gemäß Datenbanksequenz ENSG00000076242 erwarteten Fragmentgrößen.

Primername	Sequenz 5'→3'	Fragmentgröße [bp]	Verwendung
MLH1-Pro-M-F	GAT AGC GAT TTT TAA CGC	92	zum Nachweis von methylierter DNA
MLH1-Pro-M-R	TCT ATA AAT TAC TAA ATC TCT TCG		
MLH1-Pro-U-F	AGA GTG GAT AGT GAT TTT TAA TGT	100	zum Nachweis von unmethylierter DNA
MLH1-Pro-U-R	ACT CTA TAA ATT ACT AAA TCT CTT CA		

Die Charakterisierung der erhaltenen Produkte erfolgt über ein 3 % TAE-Agarose-Gel.

2.4.10 Real-Time-PCR

Für die relative Quantifizierung spezifischer Transkripte wurde die Methode der Real-Time-PCR verwendet. Bei dieser Technik werden spezifische Nukleinsäuresequenzen über PCR

amplifiziert und die Menge des vorhandenen Amplikons je PCR Zyklus gemessen. Zusätzlich zu den Primern bindet eine spezifische Sonde an der zu amplifizierenden Sequenz. Diese trägt einen Fluoreszenzfarbstoff und einen sogenannten Quencher, der die Fluoreszenz des Farbstoffs überdeckt. Wenn die Polymerase während der Primer-Elongation auf die Sonde trifft, so wird der Quencher abgespalten und die Fluoreszenz messbar. Unabhängig von der eingesetzten Templatmenge folgt die Zunahme der Amplikonmenge einem sigmoiden Kurvenverlauf bestehend aus stationärer Phase, exponentieller Phase und Plateauphase. Die Zahl der PCR Zyklen, die bis zum Erreichen der exponentiellen Phase durchlaufen werden, wird als Ct-Wert bezeichnet und lässt Rückschlüsse auf die ursprünglich vorhandene Menge an spezifischer DNA in dem eingesetzten Template zu. Je früher der Eintritt in die exponentielle Phase, desto niedriger der Ct-Wert und desto höher die Konzentration an spezifischer DNA in dem eingesetzten Template. Parallel wird ein weiteres Transkript von einem sogenannten Haushalts-Gen gemessen, für das eine konstitutive Expression angenommen wird, und das als endogene Kontrolle fungiert. Diese Messung ermöglicht die Ermittlung des Δ Ct-Wertes, der die Differenz zwischen dem Ct-Wert der Probe und dem Ct-Wert der endogenen Kontrolle beschreibt. Auch für den Δ Ct-Wert gilt, dass die Transkriptmenge der Probe umso höher ist, je niedriger der Δ Ct-Wert ausfällt.

Als Proben werden frisch synthetisierte cDNAs eingesetzt (vgl. 2.4.4.). Zur Minimierung von Fehlern werden von sämtlichen Proben und Kontrollen Triplicate angesetzt und gemessen. Jeder Ansatz wird nach dem folgenden Protokoll zusammenpipettiert:

TaqMan Universal PCR Master Mix (2x; Applied Biosystems)	12,5 μ l
Vorwärts-Primer (10 μ M)	1,0 μ l
Rückwärts-Primer (10 μ M)	1,0 μ l
Sonde (6 μ M)	1,0 μ l
Wasser	6,5 μ l
Template	3,0 μ l

Für die endogene Kontrolle werden die Ansätze wie folgt pipettiert:

TaqMan Universal PCR Master Mix (2x; Applied Biosystems)	12,5 μ l
Human TBP Endogenous Control (Applied Biosystems)	1,25 μ l
Wasser	11,25 μ l

Die Real-Time-PCR wurde mit folgendem Programm durchgeführt:

Zyklus	Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]
1 (1x)	1	50	02:00
2 (1x)	1	95	10:00
3 (40x)	1	95	00:15
	2	65	01:00

Die Primer und Sonden, die für die Bestimmung der relativen Mengen an MSH2-WT und MSH2-V1 Transkript verwendet wurden, sind in Tabelle 2.10 aufgeführt.

Tab. 2.10: Übersicht über die für die Real-Time-PCR verwendeten Primer und Sonden.

Aufgeführt sind die Primer und Sonden, die zur spezifischen Detektion der Transkripte MSH2-WT und MSH2-V1 verwendet wurden sowie die erwarteten Größen der amplifizierten Fragmente.

Primernamen	Sequenz 5'→3'	Fragmentgröße [bp]
MSH2-WT-RT-F	gaa att gga tat tgc agc agt c	80
MSH2-WT-RT-R	cca gag act gag agc cag tg	
MSH2-WT-Sonde	FAM-agc cct taa cct ttt tca ggg ttc tgt t-TAMRA	
MSH2-V1-RT-F	gga gag cag atg aat agt gct gta	88
MSH2-V1-RT-R	agg cag cca gag act gag ag	
MSH2-V1-Sonde	FAM-tgg aga atc agg gtt ctg ttg aag ata cc-TAMRA	

2.5. Immunologische Methoden

2.5.1. Antikörper

Bei den immunologischen Methoden werden Proteine mithilfe spezifischer Antikörper erkannt und können so nachgewiesen oder mittels Immunpräzipitation aus einem Lysat präzipitiert werden. Bei dem Nachweis bindet ein biotinylierter Zweitantikörper an den spezifischen Erstantikörper und vermittelt die Bindung des mit Streptavidin konjugierten Enzyms *horseradish peroxidase* an den Protein-Antikörper-Komplex. Die von diesem Enzym katalysierte Oxidation von Luminol führt zu Lumineszenz, die über Auflegen eines Röntgenfilms detektiert werden kann. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antikörper sind in der folgenden Tabelle (Tab. 2.11) aufgeführt.

Tab. 2.11: Übersicht über die Antikörper.

Aufgeführt sind die im Rahmen der immunologischen Untersuchungen verwendeten Antikörper sowie die Bezugfirmen. Darüber hinaus ist aufgeschlüsselt aus welcher Spezies die einzelnen Antikörper stammen und ob sie mono- oder polyklonal sind. Schließlich ist angegeben, mit welcher Verdünnung und im Rahmen welcher Methode der jeweilige Antikörper verwendet wurde.

Spezifität/ Antikörper	Firma	Spezies	Art von Antikörper	Verdünnung	Verwendung
MSH2 (Klon 27)	BD Biosciences	Maus	monoklonal	1:500	WB/ Co-IP
MSH3 (H-300)	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Kaninchen	polyklonal	1:200	WB
MSH3 (Klon 52)	BD Biosciences	Maus	monoklonal	1:100	Co-IP
MSH6 (Klon 44)	BD Biosciences	Maus	monoklonal	1:500	WB/ Co-IP
α Tubulin (Klon DM1A)	Sigma	Maus	monoklonal	1:1000	WB
PCNA	Abcam	Kaninchen	polyklonal	1:20000	WB
PCNA (PC 10)	Abcam	Maus	monoklonal	1:1000	Co-IP
GFP	United States Biological	Kaninchen	polyklonal	1:5000	WB/ Co-IP
Maus	GE Healthcare	Schaf	polyklonal	1:1000	WB/ Co-IP
Kaninchen	GE Healthcare	Esel	polyklonal	1:500	WB

Der GFP spezifische Antikörper bindet neben GFP auch CFP und YFP mit vergleichbarer Effizienz und wurde daher für die Detektion aller drei Fluoreszenzproteine verwendet.

2.5.2. Quantifizierung von Proteinen nach Bradford

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen in einer Lösung erfolgt nach Bradford. Dabei wird das so genannte Bradford-Reagenz (Protein Assay von Bio-Rad) verwendet, das in ungebundener Form rot erscheint und nach Bindung an Proteine blau. Über das Ausmaß der Blaufärbung einer mit Bradford-Reagenz versetzten Proteinlösung kann man daher Rückschlüsse auf die Menge der darin enthaltenen Proteine ziehen. Der Vergleich der Farbintensität mit identisch behandelten Lösungen, die definierte Konzentrationen an BSA in dem gleichen Lösungsmittel enthalten, ermöglicht eine relativ genaue Einschätzung der Proteinkonzentration in der zu untersuchenden Lösung.

2.5.3. Western Blot

Western Blot Analysen dienen dem Nachweis spezifischer Proteine. Es werden $1-5 \cdot 10^6$ Zellen 4 min bei 1000 rpm pelletiert (Centrifuge 5804, Eppendorf), zweimal in PBS gewaschen und schließlich in 50 μ l PBS aufgenommen. Anschließend werden 200 μ l 2x SDS-Probenpuffer hinzugefügt.

2x SDS-Probenpuffer: 25 ml 4x Tris-Puffer (pH 6,8)
 20 ml Glycerol
 4 g SDS
 0,1 mg Bromphenolblau
Mit Wasser auf 100 ml auffüllen und
1 ml 2-Mercaptoethanol zugeben.

Zum Denaturieren der Proteine und Nukleinsäuren werden die Proben für 10 min im Wasserbad gekocht und anschließend auf Eis abgekühlt.

Die Proben werden auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen, das aus zwei übereinander geschichteten Gelen, nämlich dem unteren Trenngel und dem oberen Sammelgel, hergestellt wird.

Trenngel (7 %): 3,5 ml Acrylamid (30 %; 37,5:1)
 3,75 ml 4x Tris (pH 6,8)
 7,75 ml Wasser
 200 µl APS (10 %)
 40 µl TEMED

Sammelgel (3,6 %) 650 µl Acrylamid (30 %; 37,5:1)
 1,25 ml 4x Tris (pH 8,8)
 3,05 ml Wasser
 50 µl APS (10 %)
 10 µl TEMED

Nachdem das Trenngel gegossen wurde, wird es mit Isopropanol überschichtet, um eine glatte Abschlusskante zu erhalten. Sobald das Trenngel fest ist, wird das Isopropanol abgegossen. Es wird mehrmals mit Wasser nachgespült, woraufhin die Glasplatten mithilfe von Filterpapier von überschüssiger Flüssigkeit befreit werden. Nun wird das Sammelgel gegossen, in das ein Kamm eingesteckt wird. Dieser führt zur Bildung der Taschen, in die später jeweils 10 µl der Proben bzw. 7 µl des Größenstandards (Kaleidoscope Prestained Standards, Bio-Rad) einpipettiert werden. Die Auftrennung der Proteine erfolgt mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) über 30 min bei 65 V und weitere 90 min bei 120 V. Der dabei verwendete Elektrophoresepuffer hat die folgende Zusammensetzung:

Elektrophoresepuffer (5x): 30 g/l Tris
 144 g/l Glycin
 5 g/l SDS

Anschließend werden die Proteine mittels halbtrockenen Elektrobottens (*semidry electroblotting*) auf eine PVDF Membran transferiert. Dabei wird folgender Semidry Blotting Buffer verwendet:

Semidry Blotting Buffer: 2,93 g/l Glycin
 0,375 g/l SDS
 5,82 g/l Tris
 20 % Methanol

Das Blotten erfolgt bei einer Spannung von 25 V und einer Stromstärke von maximal 4 mA/cm². Nach dem Blotten wird die Membran für 1 Stunde mit PBS + 5 % Milchpulver blockiert. Anschließend wird die Membran nacheinander mit in PBS + 5 % FBS vorliegendem Erstantikörper, Zweitantikörper und Streptavidin mit *horseradish peroxidase* inkubiert. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten wird die Membran jeweils 15 min in PBS + 0,1 % Tween gewaschen. Die Inkubation mit dem Erstantikörper erfolgt über Nacht. Der Zweitantikörper und Streptavidin (1:500 verdünnt) werden für jeweils 1 Stunde auf die Membran gegeben. Nach einem letzten Waschschrift wird die Membran 1 min lang mit Western Lightning Chemiluminescence Reagent (PerkinElmer LAS, Inc.) inkubiert. Dann wird ein Röntgenfilm aufgelegt und nach entsprechender Belichtungszeit entwickelt. Abschließend werden die Banden des Größenstandards durch exaktes Abpausen auf den Röntgenfilm übertragen, um eine möglichst genaue Einschätzung der molekularen Größen der detektierten Proteine zu ermöglichen. In Tabelle 2.12 sind die molekularen Größen der für die vorliegende Arbeit relevanten Proteine aufgeführt.

Tab. 2.12: Molekulare Größen der für die vorliegende Arbeit relevanten Proteine.

Die molekularen Größen der verschiedenen Proteine wurden bioinformatisch unter Verwendung von EMBOSS Pepstat ermittelt.

Protein	Molekulare Größe [kDa]
MSH2-WT	105
MSH2-V1	99
MSH3-WT	127
MSH3-V3	119
MSH3-V4	5
MSH3-V5	5
MSH6-WT	153
MSH6-V3	143
PCNA	31
CFP/GFP/YFP	27
CFP/GFP/YFP-MSH2-WT	132
CFP/GFP/YFP-MSH2-V1	126
GFP/YFP-MSH3-WT	154
GFP/YFP-MSH3-V3	146
GFP/YFP-MSH3-V4	32
GFP/YFP-MSH3-V5	32
GFP/YFP-MSH6-WT	180
GFP/YFP-MSH6-V3	170
CFP-PCNA	58
α Tubulin	50

Es gilt zu beachten, dass Abweichungen vom allein aufgrund der Größe zu erwartenden Laufverhalten auftreten können, beispielsweise wenn die detektierten Proteine Phosphorylierungen tragen. Daher empfiehlt es sich, stets eine Positivkontrolle mitzuführen.

2.5.4. 2D-Gelelektrophorese

Proteine können nicht nur über ihre molekulare Größe voneinander getrennt werden, sondern auch über ihren Isoelektrischen Punkt (IEP). Diese Tatsache wird bei der 2D-Gelelektrophorese ausgenutzt. Bei dieser Technik findet zunächst die Isoelektrische Fokussierung (IEF) statt, bei der die Proteine im immobilisierten pH-Gradienten (IPG) entsprechend ihrer IEPs aufgetrennt werden (1. Dimension). Anschließend werden die Proteine mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese zusätzlich gemäß ihrer molekularen Größen voneinander getrennt (2. Dimension). Gegenüber der eindimensionalen Polyacrylamid-Gelelektrophorese hat die 2D-Gelelektrophorese den Vorteil, dass aufgrund ähnlicher molekularer Größen schwer voneinander zu trennende Proteine über die IEF deutlich voneinander getrennt werden können, wenn die IEPs weit genug auseinander liegen. Des Weiteren kann bei der 2D-Gelelektrophorese etwa 400fach mehr Gesamtprotein untersucht werden als mit der eindimensionalen Polyacrylamid-Gelelektrophorese, so dass die Detektion in geringer Konzentration vorliegender Proteine deutlich erleichtert wird.

Für die 2D-Gelelektrophorese werden ca. $20 \cdot 10^6$ Zellen 4 min bei 1000 rpm pelletiert (Centrifuge 5804, Eppendorf), 3x in PBS gewaschen und in 1,5 ml Quellslösung aufgenommen.

Quellslösung:	5,4 g	Urea mit deionisiertem H ₂ O auf 10 ml auffüllen und lösen
	1,5 g	Thioharnstoff
	400 mg	CHAPS
	2 mg	Tris
	46 mg	DTT

Um die Nukleinsäuren abzubauen, werden jeweils 2 µl Benzonase zugegeben. Als Protease-Inhibitoren werden PMSF (100 µg/ml), Pepstatin (10 µM) und Aprotinin (1 µg/ml) verwendet. Die Zellen werden 1 Stunde lang unter Schütteln inkubiert. Anschließend werden die Proben mit dem Ultraschallgerät Sonoplus 200 (Bandelin) unter Verwendung der Mikrotip behandelt. Mit bis zu 4x 10 Impulsen à 2 sec bei maximaler Leistung für die Mikrotip werden noch unverdaute Nukleinsäuren zerkleinert.

Es folgt die Extraktion der Proteine. Dazu werden nacheinander 6 ml Methanol, 1,5 ml Chloroform und 4,5 ml deionisiertes Wasser zu den Proben gegeben und diese jeweils gevortext. Die Proben werden 5 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert (Tischzentrifuge 2K15C, Sigma). Es bilden sich zwei Phasen und eine Interphase, die die Proteine enthält. Bis auf die Interphase wird alles verworfen. Das Pellet wird mit 4,5 ml Methanol gewaschen und 10 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert (Tischzentrifuge 2K15C, Sigma). Der Überstand wird verworfen und das Pellet bei RT getrocknet. Die Resuspension erfolgt über Nacht in 300 µl Quellschlösung mit PMSF, Pepstatin und Aprotinin (Konzentrationen wie oben angegeben) bei 4 °C im Schüttler. Am nächsten Tag wird die Konzentration der Proteine nach Bradford bestimmt (vgl. 2.5.2.). Je Probe werden 3x 500 µg Protein mit Quellschlösung auf ein Volumen von 380 µl aufgefüllt und mit 0,5-2 % Puffer versetzt, der dem jeweils verwendeten IPG-Streifen entspricht. Außerdem werden jeweils 0,001 % Bromphenolblau zugegeben, um den Erfolg der IEF überprüfen zu können. Die Proben werden auf die IPG-Streifen gegeben und durch Überschlötung mit Silikonöl vor dem Austrocknen geschützt. Die Auftrennung der Proteine im immobilisierten pH-Gradienten erfolgt im IPGphor (Pharmacia Biotech) unter Verwendung des folgenden Programms:

Schritt	Zeit [h]	Spannung [V]	Art der Spannung
1 (Rehydratation)	14	30	konstant
2	3	100	sich allmählich aufbauend
3	3	300	sich allmählich aufbauend
4	3	3000	sich allmählich aufbauend
5	1	5500	sich allmählich aufbauend
6	20	5500	konstant
7	2	8000	sich allmählich aufbauend
	∞	8000	konstant

Die IEF wird mit 165 kVh beendet. Ebe die gemäß ihrer IEPs aufgetrennten Proteine mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese entsprechend ihrer molekularen Größen voneinander getrennt werden, werden die IPG-Streifen äquiliбриert.

Äquiliбриerlösung: 50 mM Tris/HCl; pH 8,8
 6 M Urea
 30 % Glycerol
 2 % SDS

In einem ersten Schritt werden die IPG-Streifen unter Schütteln 10 min in Äquiliбриerlösung + 1 % DTT inkubiert. Anschließend werden sie für weitere 10 min in Äquiliбриerlösung + 4,8 % Jodacetamid inkubiert. Dann werden die IPG-Streifen auf die Kante eines Polyacrylamid-Gels

(Gradient von 10 bis 15 %) gelegt und mit 1 % Agarose in Tankpuffer fixiert. Um die Polyacrylamid-Gelelektrophorese anhand der Lauffront besser verfolgen zu können, wird die in Tankpuffer vorliegende Agarose mit 0,001 % Bromphenolblau versetzt. Die Elektrophorese erfolgt im Anderson-Iso-Dalt[®] Electrophoresis System (Hoefer Scientific Instruments) bei 100 V für 2 Stunden in dem folgenden Puffer:

Tankpuffer:	24 mM	Tris
	0,2 M	Glycin
	0,1 %	SDS

Der Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran sowie die Detektion der Proteine werden wie unter 2.5.3. beschrieben durchgeführt. Dabei erfolgt das Blotten über ca. 1 Stunde.

2.5.5. Co-Immunpräzipitation

Mittels Co-Immunpräzipitation können Protein-Protein-Interaktionen aufgezeigt werden. Über einen spezifischen Antikörper wird ein Protein aus dem Zelllysate präzipitiert, und zwar unter Bedingungen, unter denen Bindungen zwischen verschiedenen Proteinen aufrechterhalten werden. Daher werden diejenigen Proteine, die mit dem vom Antikörper gebundenen Protein interagieren, co-immunpräzipitiert und können anschließend spezifisch nachgewiesen werden.

Die Co-Immunpräzipitation wurde mit einem GFP spezifischen Antikörper (Tab. 2.11) und unter Verwendung des Nuclear Complex Co-IP Kits von Active Motif durchgeführt. Bei Anwendung dieses Kits findet zunächst eine Trennung der nukleären von der cytoplasmatischen Fraktion statt. Dies erlaubt eine differenzierte Untersuchung und hat außerdem den Vorteil, dass in nur einer der beiden Fraktionen auftretende Proteine höher konzentriert vorliegen als wenn beide Fraktionen miteinander vermischt würden.

Zur Durchführung wurden die nachfolgend aufgeführten Puffer jeweils frisch angesetzt, wobei die angegebenen Mengen auf eine Probe von $1 \cdot 10^7$ Zellen abgestimmt sind.

Phosphataseinhibitorpuffer (PIP):	6,8 ml	Wasser (deionisiert)
	0,8 ml	10x PBS
	0,4 ml	Phosphatase Inhibitor
Hypotonischer Puffer (HypoP):	450 µl	Wasser (deionisiert)
	50 µl	10x hypotonischer Puffer

Verdaupuffer:	98,5 µl	Verdaupuffer
	1 µl	Protease Inhibitor Cocktail (PIC)
	0,5 µl	PMSF (100 mM)
Co-IP Puffer:	400 µl	Wasser (deionisiert)
	100 µl	5x IP Low Buffer
	2,5 µl	Protease Inhibitor Cocktail (PIC)
	2 µl	GFP Antikörper
Waschpuffer:	1,6 ml	Wasser (deionisiert)
	400 µl	5x IP Low Buffer
	4 µl	Protease Inhibitor Cocktail (PIC)

Je Co-Immunpräzipitation werden 10^7 Zellen geerntet und in Phosphataseinhibitor-Puffer (PIP) aufgenommen. Die Zellen werden 4 min bei 1000 rpm pelletiert (Centrifuge 5804, Eppendorf) und in hypotonischem Puffer (HypoP) resuspendiert. Nach 15minütiger Inkubation werden 25 µl Detergenz zugegeben. Nach weiteren 5 min Inkubation werden die Zellkerne 30 sec bei 4 °C und 10000 rpm (Tischzentrifuge Sepatech Biofuge A, Heraeus) pelletiert. Der Überstand, der der cytoplasmatischen Fraktion entspricht, wird abgenommen und bei -20 °C eingefroren oder später für die Co-Immunpräzipitation eingesetzt. Das Kernpellet wird in 100 µl Verdaupuffer mit 0,5 µl Enzymatic Shearing Cocktail aufgenommen und 10 min bei 37 °C inkubiert, um die DNA zu fragmentieren. Die Reaktion wird mit 2 µl EDTA gestoppt. Dann werden die DNA sowie Membranreste 10 min bei 4 °C und 13000 rpm pelletiert (Tischzentrifuge Sepatech Biofuge A, Heraeus). Der Überstand, der die nukleären Proteine enthält, wird zu 500 µl Co-IP Puffer mit GFP-Antikörper und 1 µl PMSF gegeben. Sofern mit der cytoplasmatischen Fraktion eine Co-Immunpräzipitation durchgeführt werden soll, wird sie ebenfalls mit 500 µl Co-IP Puffer und 1 µl PMSF vermischt und im Folgenden wie die nukleäre Fraktion weiterbehandelt. Der Ansatz wird über Nacht im Über-Kopf-Schüttler bei 4 °C inkubiert. Am Folgetag werden 50 µl in Waschpuffer gewaschene und resuspendierte ProteinG Beads + 0,25 µl PIC zugegeben, und 1 Stunde bei 4 °C im Über-Kopf-Schüttler inkubiert. Während dieser Inkubation binden die ProteinG Beads den Antikörper. Anschließend werden die Beads mit dem gebundenen Antikörper und den daran gebundenen Proteinen 30 sec bei 4 °C und 4000 rpm pelletiert (Tischzentrifuge Sepatech Biofuge A, Heraeus). Der Überstand wird verworfen und die präzipitierten Proteine werden mit Waschpuffer gewaschen. Dieser Vorgang wird dreimal wiederholt. Dann wird das Pellet in 2x SDS-Ladepuffer aufgenommen und 5 min bei 65 °C erwärmt. Schließlich wird

ein Drittel des Co-Immunpräzipitats aus der nukleären bzw. cytoplasmatischen Fraktion auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Die Detektion der präzipitierten Proteine erfolgt nach dem unter 2.5.3. beschriebenen Protokoll für die Western Blot Analyse und unter Verwendung der in Tabelle 2.11 aufgeführten Antikörper.

2.6. *Live-cell imaging*

Sämtliche in der vorliegenden Arbeit präsentierten *live-cell imaging* Aufnahmen wurden in Zusammenarbeit mit C. Mielke an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf erstellt.

Das *live-cell imaging* stellt eine nicht-invasive Methode zur Untersuchung lebender Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie dar. Es findet unter optimalen Kulturbedingungen statt, wobei eine den Objektisch umschließende Inkubationseinheit eine konstante Temperatur von 37 °C und die Verwendung von gepuffertem Kulturmedium einen stabilen pH-Wert von 7,2 gewährleistet. Das *live-cell imaging* ermöglicht so die Aufklärung molekularer Vorgänge vor dem Hintergrund natürlicher, zellulärer Prozesse. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die zu untersuchenden Proteine zur Durchführung des *live-cell imaging* mit den Fluoreszenzproteinen CFP, GFP oder YFP fusioniert. Die Eigenschaften dieser Fluorochrome sind in Tabelle 2.13 aufgeführt.

Tab. 2.13: Übersicht über die Absorptions- und Emissionsmaxima von CFP, GFP und YFP.

Fluoreszenzprotein	Absorptionsmaximum	Emissionsmaximum
CFP	433 nm	475 nm
GFP	488 nm	507 nm
YFP	514 nm	527 nm

2.6.1. Epifluoreszenzmikroskopie

Bei der Epifluoreszenzmikroskopie wird die von der gesamten Dicke einer Zelle emittierte Fluoreszenz aufgenommen. Dies hat zur Folge, dass die Fluoreszenzintensität relativ stark erscheint. Allerdings ist die Schärfe der Aufnahmen begrenzt, da die Fluoreszenz der sich außerhalb der Brennebene befindenden Teile der Zelle die aus der Brennebene stammende Fluoreszenz überlagert. Für die Epifluoreszenzaufnahmen wurde das Axiovert 100 Mikroskop von Zeiss verwendet. Die Darstellung der Bilder in digitaler Form erfolgt mithilfe der

Software Meta Series 6.3 (Molecular Devices). Die Aufrechterhaltung der optimalen Temperatur von 37 °C wird durch die Inkubationseinheit Δ TC3 (Bioprotech) gewährleistet.

2.6.2. Konfokale Mikroskopie

Von der Epifluoreszenzmikroskopie unterscheidet sich die konfokale Mikroskopie, indem ein Bild von der Fluoreszenz aus nur einer spezifischen Brennebene des untersuchten Objekts gewonnen wird. In der vorliegenden Arbeit wurden die konfokalen Bilder mit dem Laser Scanning Mikroskop 510 Meta von Zeiss aufgenommen. Sie entsprechen einer Schichtdicke von 800 nm. Die Darstellung erfolgt mit der zugehörigen Software (Version 3.2, Service Pack 2). Die Fluorophore werden mithilfe eines Argonlasers angeregt, und zwar entsprechend der in Tabelle 2.13 aufgeführten Absorptionsmaxima mit einer Laserlinie von 458 nm, 488 nm oder 514 nm für CFP, GFP bzw. YFP. Die Aufnahme von Referenzspektren für CFP und YFP ermöglicht die Trennung der entsprechenden Emissionen im Falle derjenigen Zellen, die sowohl mit CFP als auch mit YFP fusionierte Proteine exprimieren. Während der Aufnahmen wird mithilfe der Inkubationseinheit XL (Zeiss) eine konstante Temperatur von 37 °C aufrechterhalten.

2.6.3. FRET Analysen

Zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen über den Fluoreszenz-Resonanzenergie-Transfer (FRET) wurden die zu untersuchenden Proteine mit CFP bzw. YFP fusioniert. Die Aufnahmen sollten an dem Laser Scanning Mikroskop 510 Meta von Zeiss gemacht werden. Mit einer Laserlinie von 458 nm erfolgt die Anregung von CFP durch einen Argonlaser. Bei gegebener räumlicher Nähe der beiden Fluoreszenzproteine von 1-10 nm ermöglicht die teilweise Überlappung des Emissionsspektrums von CFP und des Absorptionsspektrums von YFP den Fluoreszenz-Resonanzenergie-Transfer. Detektiert wird die Emission von YFP.

3. Ergebnisse

Der vorliegende Ergebnisteil befasst sich mit der Analyse von den Komponenten der Fehlpaarungsreparatur (MMR), die die Fehlererkennung an der DNA realisieren, nämlich MSH2, MSH3 und MSH6. Die Untersuchungen sind in vier Abschnitte untergliedert, von denen sich der erste mit dem Expressionsprofil der genannten MSH Gene in humanen Tumorzelllinien mit Mikrosatelliten Instabilität (MSI) aus verschiedenen Geweben befasst. In diese Untersuchungen wird MLH1 einbezogen, da gemäß Literatur sowohl in vererbten als auch in sporadischen Darmtumoren das Fehlen von funktionalem MLH1 Protein die häufigste Ursache für eine defekte MMR ist (Peltomäki & Vasen 2004). Im zweiten Abschnitt wird der Nachweis von alternativen Transkripten für MSH2, MSH3 und MSH6 beschrieben, während der dritte Teil die rekombinante Expression der entsprechenden cDNAs sowie die funktionale Charakterisierung der isoformen Proteine behandelt. Im vierten Abschnitt werden Ergebnisse zur Regulation der MMR vorgestellt.

3.1. Ursachen für MSI in humanen Zelllinien aus Tumoren verschiedener Gewebe

Das Phänomen der MSI wird durch ein defektes MMR System verursacht (Peltomäki 1994). Die meisten Daten über die Ursachen von MSI liegen in Bezug auf primäres Tumormaterial von Patienten mit einem hereditären nichtpolypösen kolorektalen Karzinom (HNPCC) vor. Aus einer vorab an der DSMZ durchgeführten BAT26 Analyse sind 41 humane Zelllinien bekannt, die aus Tumoren unterschiedlicher Gewebe stammen und MSI aufweisen (Dirks et al. 2004, Tagungsbeitrag; Tab. 3.1). Die vorliegende Arbeit wurde mit Untersuchungen zu den Ursachen für MSI in diesen humanen Zelllinien begonnen. Zur Erstellung eines Expressionsprofils wurden die Linien mittels Western Blot Technik zunächst daraufhin analysiert, ob die MMR Proteine MSH2, MSH3, MSH6 und MLH1 nachweisbar sind. Im Anschluss daran wurden die Transkripte der Gene MSH2, MSH3 und MSH6 über die Reverse Transkription - Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) Technik untersucht. Diese sensitive Analyse sollte aufzeigen, ob der MSI möglicherweise ein Abschalten der Genexpression von MSH2, MSH3 oder MSH6 zugrunde liegt. Desweiteren sollten Größenvariationen der Transkripte detektiert werden, die aufgrund geringer Auftrennung der Western Blot Technik

auf Proteinebene nicht nachweisbar sind oder zum Fehlen des Proteins führen. Für MLH1 wurde in denjenigen Zelllinien, in denen das entsprechende Protein nicht nachgewiesen werden konnte, anhand der *methylation-specific PCR* (MSP) Technik ermittelt, ob eine Methylierung derjenigen Promotorbereiche vorliegt, die nach Capel et al. (2007) mit einem Abschalten der Genexpression von MLH1 korreliert. Sehr kleine Insertions- und Deletionsmutationen sowie Punktmutationen können mit den angewandten Methoden nicht detektiert werden.

Tab. 3.1: Übersicht über die 41 untersuchten MSI Zelllinien.

Auflistung der untersuchten Zelllinien mit Angaben zur Art des Tumors, aus dem sie etabliert wurden.

	Zelllinie	Beschreibung		Zelllinie	Beschreibung
T-Zellen	CCRF-CEM	T-Zell-Leukämie	Lunge	DV-90	Lungenadenokarzinom
	CML-T1	T-Zell-Leukämie		H-1339	Kleinzelliges Lungenkarzinom
	DND-41	T-Zell-Leukämie		H-1963	Kleinzelliges Lungenkarzinom
	HPB-ALL	T-Zell-Leukämie		HCC-15	Nichtkleinzelliges Lungenkarzinom
	HSB-2	T-Zell-Leukämie	Sonstige Gewebe	AN3-CA	Gebärmutterschleimhaut Adenokarzinom
	JURKAT	T-Zell-Leukämie		MFE-296	Gebärmutterschleimhaut Adenokarzinom
	KARPAS-45	T-Zell-Leukämie		MFE-319	Gebärmutterschleimhaut Adenokarzinom
	MOLT-17	T-Zell-Leukämie		22RV1	Prostatakarzinom
	SUP-T1	T-Zell-Lymphom		DU-145	Prostatakarzinom
B-Zellen	DG-75	Burkitt-Lymphom		LNCAP	Prostatakarzinom
	MHH-PREB-1	B-Zell-Lymphom		CTV-1	Akute myeloische Leukämie
	NALM-1	Precursor B-Zell Leukämie		KCL-22	Chronische myeloische Leukämie in der Blastenkrise
	NALM-6	Precursor B-Zell Leukämie		COLO-704	Eierstock Adenokarzinom
	NCI-H929	Multiples Myelom		EFO-27	Eierstock Adenokarzinom
	RS4;11	Precursor B-Zell Leukämie		639-V	Harnleiterkarzinom
Darm	TANOUE	B-Zell-Leukämie		BFTC-905	Harnblasenkarzinom
	CL-34	Kolonkarzinom		23132/87	Magenadenokarzinom
	DLD-1	Kolonadenokarzinom		MT-3	Brustkarzinom
	HCT-15	Kolonadenokarzinom		CAL-72	Osteosarkom
	LOVO	Kolonadenokarzinom		LN-405	Astrozytom
				RH-18	Rhabdomyosarkom

3.1.1. MMR Proteine in MSI Zelllinien

Die Expression der Proteine MSH2, MSH3, MSH6 und MLH1 wurde mithilfe der Western Blot Technik unter Einsatz von spezifischen Antikörpern ermittelt. Durch das Mitführen von Positiv- und Negativkontrollen in jeder Analyse konnte eine eindeutige Aussage über An- oder Abwesenheit der untersuchten Proteine gemacht werden. In Bezug auf die MSH Proteine wurden vier verschiedene Expressionsmuster gefunden. Diese Muster sind in Abbildung 3.1 repräsentativ dargestellt; Details zu den Ergebnissen sind in Tabelle 3.2 aufgeführt.

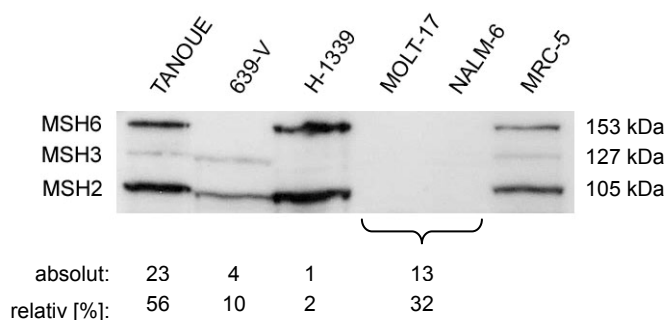


Abb. 3.1: Expressionsmuster der Proteine MSH2, MSH3 und MSH6.

Repräsentativer Westernblot von verschiedenen humanen Tumorzelllinien mit MSI. Der Nachweis erfolgte mit monoklonalen Antikörpern gegen MSH2, MSH3 und MSH6. Aufgetragen wurde jeweils Lysat aus $5 \cdot 10^4$ Zellen. Als Positivkontrolle wurde Lysat eines gesunden Donors (Primärlinie MRC-5) eingesetzt. Die Zahlen unter den einzelnen Lanes geben die Häufigkeit des jeweils dargestellten Expressionsmusters in den 41 untersuchten MSI Zelllinien an.

Das Expressionsmuster der Zelllinie TANOUE ist in Abbildung 3.1 stellvertretend für die 23 (56 %) Linien dargestellt, in denen alle drei MSH Proteine nachweisbar waren. In 5 (12 %) der Linien konnten nur zwei der MSH Proteine detektiert werden, und zwar entweder MSH2 und MSH3 wie in 639-V oder MSH2 und MSH6 wie in H-1339. MOLT-17 und NALM-6 repräsentieren die 13 (32 %) Linien, in denen sich keines der drei MSH Proteine messen ließ. Ein MSH Protein allein ohne die Anwesenheit eines zweiten konnte nicht detektiert werden. Zwar wurde von einigen Zelllinien wie beispielsweise MOLT-17 auf einigen Blots ein schwaches Signal für MSH6 erhalten, obwohl weder MSH2 noch MSH3 nachweisbar waren; allerdings war dieses Ergebnis nicht reproduzierbar. Offensichtlich liegt die Menge an MSH6 Protein in diesen Linien an der Nachweisgrenze und wird deshalb als nicht detektierbar eingestuft. Einzeln betrachtet fehlt MSH2 in 13 (32 %), MSH3 in 14 (34 %) und MSH6 in 17 (41 %) aller MSI Zelllinien, wobei die 13 Zelllinien ohne MSH2 auch kein MSH3 und kein MSH6 aufweisen. MLH1 fehlt in 7 (17 %) der untersuchten Zelllinien (Tab. 3.2).

Bei Betrachtung von MLH1 zusätzlich zu den MSH Proteinen MSH2, MSH3 und MSH6 findet sich in 23 (56 %) der untersuchten Zelllinien eine Korrelation zwischen Abwesenheit von Protein und defekter MMR. Bei den übrigen 18 (44 %) der Zelllinien kann MSI darauf beruhen, dass die exprimierten Proteine nicht funktional sind oder dass andere an der MMR beteiligte Proteine fehlen bzw. ihre Funktionen verloren haben. In Bezug auf die MSH Proteine wurden vier Expressionsmuster gefunden. Es konnten entweder drei, zwei (MSH2/MSH3 oder MSH2/MSH6) oder keins der MSH Proteine detektiert werden. In den

Fällen, in denen zwei der MSH Proteine nachweisbar waren, handelte es sich bei einem von beiden stets um MSH2. Dies legt die Vermutung nahe, dass MSH3 und MSH6 durch die Heterodimerisierung mit MSH2 stabilisiert werden, als Monomere hingegen instabil sind.

3.1.2. Untersuchung der MSH Transkripte in MSI Zelllinien

3.1.2.1. MSH Transkripte in MSI Zelllinien

Die Analyse von Expression und Größenvariationen der Transkripte von MSH2, MSH3 und MSH6 erfolgte über die Technik der Reverse Transkription - Polymerasekettenreaktion (RT-PCR). Mit spezifischen Primern können ausgewählte Sequenzen, die den ursprünglichen RNA-Sequenzen entsprechen, amplifiziert und untersucht werden. Um auch kleine Veränderungen von ca. 50 bp in der Transkriptgröße sichtbar machen zu können, wurden die codierenden Regionen der Transkripte in 3 bis 5 Bereiche von maximal 1200 bp aufgeteilt, die mithilfe spezifischer Primer einzeln amplifiziert wurden (Abb. 3.2).

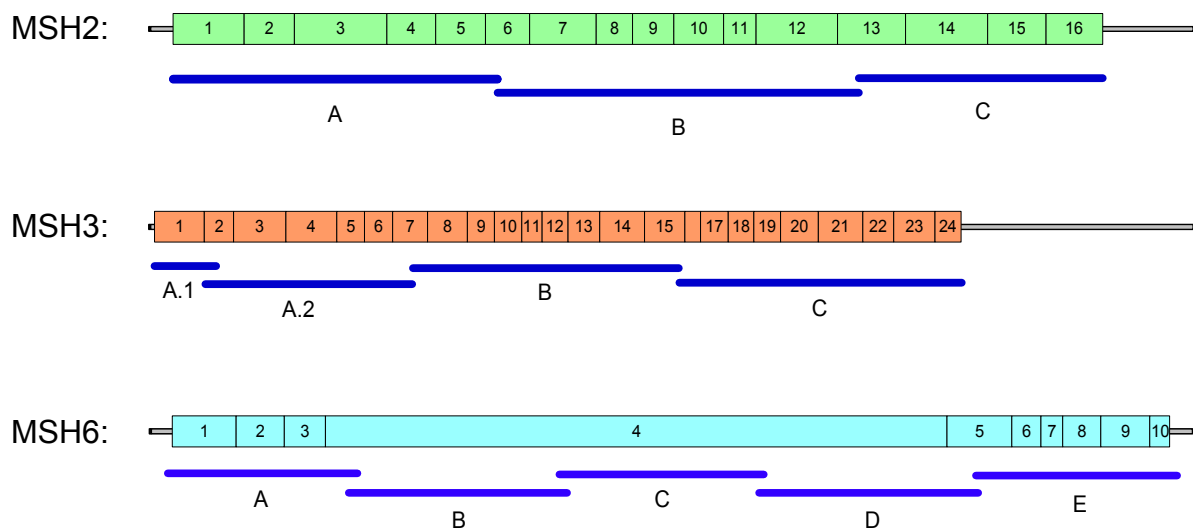


Abb. 3.2: Strategie zur Untersuchung der MSH Transkripte mittels RT-PCRs.

Die codierenden Regionen der Transkripte von MSH2, MSH3 und MSH6 wurden in 3 bis 5 Bereiche aufgeteilt, die einzeln amplifiziert wurden. Die Abbildung gibt Auskunft über die Bezeichnung der einzelnen Fragmente und darüber, welche der in Form durchnummerierter Kästchen dargestellten Exons von ihnen überspannt werden.

Vor allem Verunreinigungen der RNA mit genomischer DNA, die aufgrund der gewählten Methode der RNA-Isolierung (vgl. 2.4.2.) nicht auszuschließen sind, können bei der RT-PCR auf Pseudogene zurückzuführende falsch-positive Ergebnisse erzeugen. Deshalb wurde überprüft, ob im humanen Genom Pseudogene von den Genen MSH2, MSH3 und MSH6 existieren. Zu diesem Zweck wurden über Ensembl Multi Blast View (<http://www.ensembl.org/Multi/blastview>) drei verschiedene Exons pro Gen im humanen Genom gesucht und jeweils nur ein einziges Mal gefunden. Demzufolge liegen alle drei Gene als Einzelkopie vor. Zusätzlich wurde parallel zu den RT-PCRs genomische DNA als Negativkontrolle eingesetzt (Abb. 3.3).

Aus den zu untersuchenden Linien wurden jeweils 5 µg Gesamt RNA in cDNA umgeschrieben und gleiche Mengen cDNA als Template für die spezifischen PCRs eingesetzt. Die Qualität der cDNA wurde mit exonspezifischen Primern für das ABL Gen als interne Kontrolle überprüft. Die MSH spezifischen Fragmente wurden mit den von einer Positivkontrolle amplifizierten Fragmenten auf ein Agarose-Gel aufgetragen und ihre Größen wurden miteinander verglichen. Im Falle des 5'-Bereichs von MSH3 (MSH3-A.1) erfolgte die Größenbestimmung über die sensitivere Kapillarelektrophorese, da die entsprechenden Signale im Agarose-Gel zu schwach waren, um eine Auswertung zuzulassen. Aus diesem Grund wurde für die Amplifikation des Fragments MSH3-A.1 ein fluoreszenzmarkierter Vorwärts-Primer verwendet. Die Daten wurden reproduziert, wenn die erhaltenen Fragmente von den Wildtypfragmenten der Positivkontrolle abwichen. Wurden hingegen Signale der erwarteten Größe detektiert, so wurde die Analyse nur einmal durchgeführt.

In Abbildung 3.3 sind exemplarisch die Agarose-Gele der RT-PCRs für die T- und B-Zelllinien mit MSI dargestellt. Ein repräsentatives Elektropherogramm findet sich in Abbildung 3.4a. Eine Übersicht über die Ergebnisse aller RT-PCR Analysen ist der Tabelle 3.2 zu entnehmen.

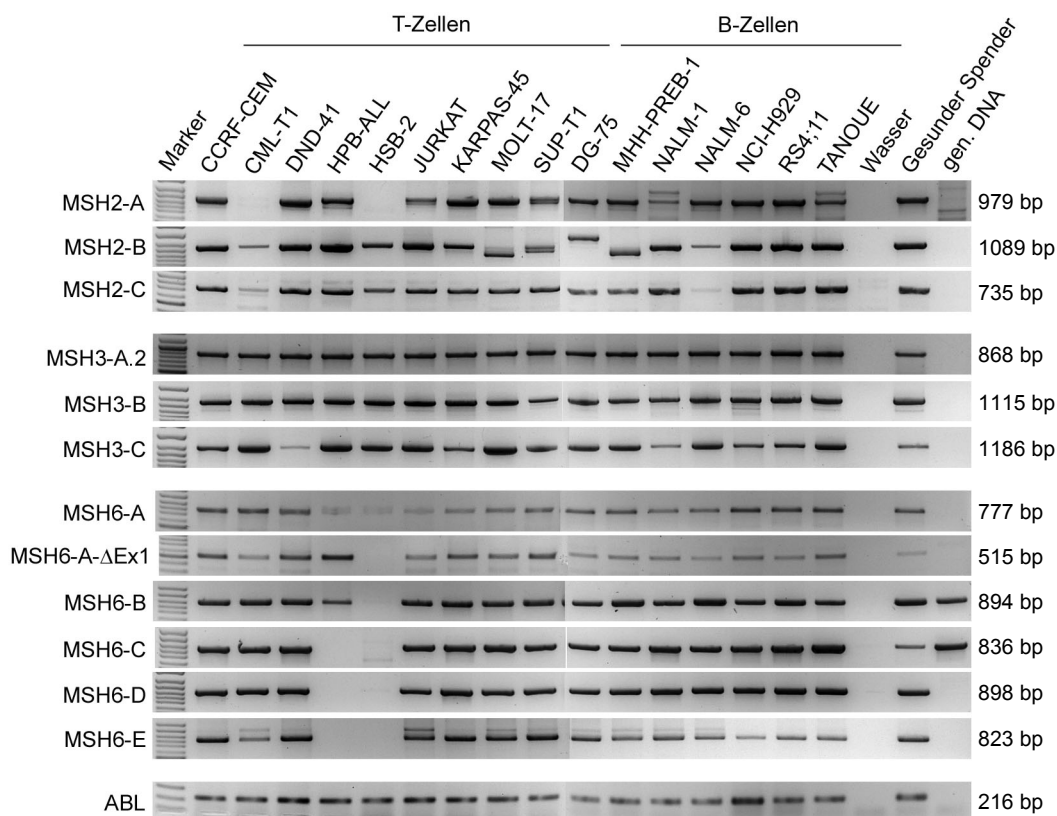


Abb. 3.3: Nachweis der MSH Transkripte.

Mit Ausnahme des Fragments MSH3-A.1 (Abb. 3.4a) konnten die Fragmentgrößen über Agarose-Gelelektrophorese ermittelt werden. Anhand der ABL Fragmente ist die einheitliche Qualität der als Template verwendeten cDNAs zu erkennen. Die von der cDNA eines gesunden Spenders amplifizierte Fragmente dienen als Positivkontrolle und ermöglichen den direkten Vergleich der Fragmentgrößen. Von der genomischen DNA wurden in der Regel keine Fragmente erhalten, wodurch experimentell gezeigt wurde, dass im humanen Genom keine auf cDNA Insertion zurückzuführenden Pseudogene von MSH2, MSH3 und MSH6 existieren. Die von der genomischen DNA erhaltenen Fragmente MSH6-B und MSH6-C lassen sich darauf zurückführen, dass die zu ihrer Amplifikation verwendeten Primer auf dem gleichen Exon lagen, weshalb kein Intron überspannt wurde (Abb. 3.2). Auf das in den meisten Linien detektierte Fragment MSH6-A-ΔExon1 wird unter 3.2.1. näher eingegangen.

In 73 % der Zelllinien konnten sämtliche Fragmente ohne Abweichungen von dem Fragment detektiert werden, das von der cDNA des gesunden Spenders erhalten wurde. Das bedeutet, dass die Transkripte von den Genen MSH2, MSH3 und MSH6 in den meisten Zelllinien vollständig vorliegen. Abweichungen traten vor allem bei dem Transkript für MSH2 auf, nämlich in 8 der 41 untersuchten Zelllinien (20 %). Dabei konnte in zwei Zelllinien das Fragment MSH2-A gar nicht nachgewiesen werden und in den übrigen Fällen wiesen entweder das Fragment MSH2-A oder MSH2-B deutliche Größenabweichungen auf.

Die offensichtlich veränderten MSH2-B Fragmente wurden sequenziert, um die genauen Ursachen der Veränderungen zu ermitteln. Dabei stellte sich heraus, dass bei MOLT-17 das

Exon 7 und bei MHH-PREB-1 das Exon 10 fehlten, sowie dass bei DG-75 die aus Exons 9 und 10 bestehende Kassette doppelt vorhanden war. Ob diese Veränderungen auf aberrante Spleißereignisse oder auf Deletionen bzw. Insertionen im Gen zurückzuführen sind, kann über die Untersuchung der genomischen DNA aufgeklärt werden. Von MSH3 und MSH6 wurden keine Fragmente mit abweichenden Größen gefunden. Allerdings war das MSH3 Transkript in zwei (5 %) und das MSH6 Transkript in 4 (10 %) der Zelllinien nicht vollständig nachweisbar. Aus Tabelle 3.2 ist ersichtlich, dass eine detektierbare Variation des Transkripts immer zum Verlust des entsprechenden Wildtypproteins führte.

Insgesamt hat die Untersuchung der MSH2, MSH3 und MSH6 Transkripte für 27 % der 41 MSI Zelllinien eine Korrelation zwischen einer nachweisbaren Variation eines Transkripts und einem MMR Defekt ergeben. Auffallend ist, dass in jeder Zelllinie mindestens eines der definitiv von cDNA amplifizierten Fragmente A-C von dem MSH2 und MSH3 Transkript bzw. A, D oder E von dem MSH6 Transkript detektiert werden konnte. Dies bedeutet, dass die Gene MSH2, MSH3 und MSH6 stets zumindest in Teilen vorhanden sind und transkribiert werden. Dementsprechend kommt ein Abschalten der Genexpression als epigenetische Ursache für die Ausprägung von MSI nicht in Frage.

3.1.2.2. Polymorphismus des MSH3 Gens

Bei der Analyse der MSH3-A.1 Fragmente über die Kapillarelektrophorese, die eine auf ein Nukleotid genaue Größenbestimmung von 60-600 bp umfassenden Fragmenten ermöglicht, konnte eine Längenvariation um 9 bp bzw. ein Vielfaches davon beobachtet werden. Ein entsprechendes Elektropherogramm ist in Abbildung 3.4a dargestellt. Dass es sich bei diesem Phänomen um einen Polymorphismus handelt, bei dem eine Sequenz von 9 bp unterschiedlich oft wiederholt vorliegt, wurde über den Nachweis der gleichen Variabilität bei Analyse der genomischen DNA sowie über Sequenzierung bestätigt (Abb. 3.4a und 3.4b). Die 9 bp Wiederholung war entweder drei-, fünf-, sechs- oder siebenmal in dem MSH3 Gen enthalten, weshalb die entsprechenden Allele mit 3, 5, 6 oder 7 beziffert wurden.

Um nachzuweisen, ob eine Korrelation zwischen bestimmten Allelen und MSI besteht, wurden die Allelfrequenzen in MSI und MSS Linien ermittelt (Abb. 3.4c). Schon bei dem mit n=15 relativ geringen Stichprobenumfang für die MSS Linien zeichnet sich eine im Hinblick

auf die MSI Linien vergleichbare Allelfrequenz ab. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen bestimmten Allelen des MSH3 Gens und MSI konnte also nicht festgestellt werden.

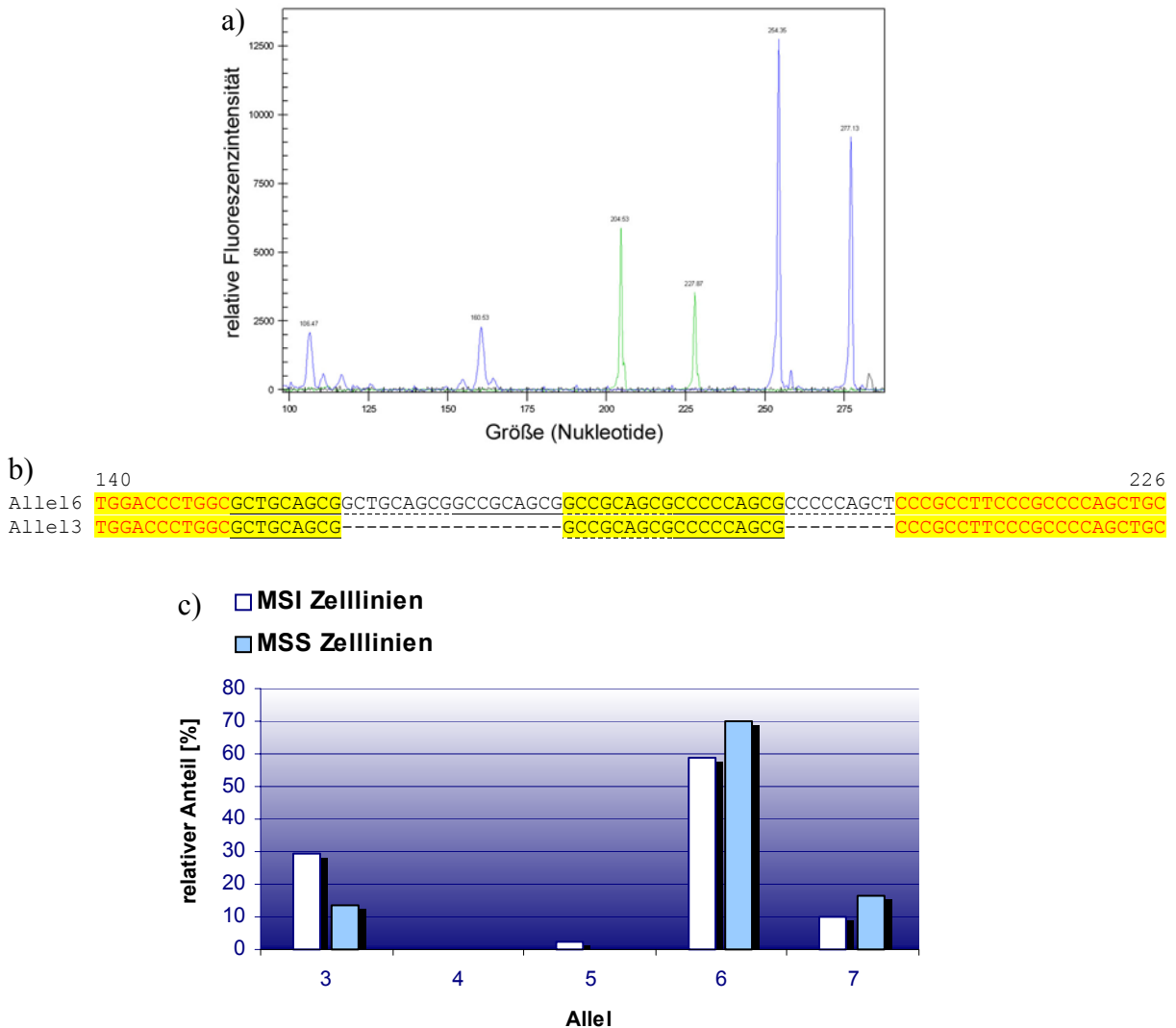


Abb. 3.4: Polymorphismus des MSH3 Gens.

a) Die Größen der MSH3-A.1 Fragmente wurden mittels Kapillarelektrophorese bestimmt. Abgebildet ist ein von der MSS Zelllinie FE-PD erhaltenes Elektropherogramm, das die von MSI und MSS Zelllinien erhaltenen Elektropherogramme repräsentiert. Unter Verwendung der Primer zur Amplifikation des Fragments MSH3-A.1 wurden von der cDNA einer einzelnen Zelllinie bis zu vier Fragmente erhalten, die durch die blauen Peaks dargestellt sind. Das Auftreten der beiden großen Fragmente wies auf die Existenz verschiedener Allele des MSH3 Gens hin, die über eine entsprechende Untersuchung der genomischen DNA bestätigt werden konnte (grüne Peaks). Die Ursache für die beiden stark verkürzten Transkriptfragmente wird unter 3.2.1. angegeben.

b) Vergleich der DNA Sequenzen des vom Polymorphismus betroffenen Bereichs von Allel6 und Allel3 des MSH3 Gens aus der Zelllinie FE-PD (Nukleotide 140-226; als Nukleotid 1 wird das A des Startcodons gezählt), wobei die Sequenz von Allel6 mit der unter NM_002439.2 in der Datenbank hinterlegten Sequenz übereinstimmt. Die 9 bp umfassenden sich in unterschiedlicher Zahl wiederholenden Sequenzabschnitte sind abwechselnd durchgehend und punktiert unterstrichen, identische Sequenzen sind gelb unterlegt.

c) Allelfrequenz des MSH3 Gens in MSI und MSS Zelllinien. Dargestellt sind die relativen Anteile der Allele 3-7 an sämtlichen MSH3 Allelen aus einer Gruppe von MSI Zelllinien (n=41) und einer Gruppe von MSS Zelllinien (n=15).

3.1.3. MLH1 Promotormethylierung in MSI Zelllinien

In 7 der untersuchten MSI Zelllinien konnte kein MLH1 Protein nachgewiesen werden (Tab. 3.2). Da in der Literatur als häufigste Ursache für MSI in sporadischen Darmtumoren ein Abschalten der Genexpression von MLH1 durch Promotormethylierung angegeben wird (Peltomäki & Vasen 2004), sollte überprüft werden, ob in diesen Zelllinien eine entsprechende Methylierung des MLH1 Promotors vorliegt.

Bei der Methylierung von DNA im Promotorbereich werden Methylgruppen an die Cytosine von CpG Dinukleotiden angehängt, die sich oft in sogenannten CpG Inseln häufen. Mithilfe der sogenannten Bisulfit Konversion und anschließender *methylation-specific PCR* (MSP) können methylierte Cytosine detektiert werden. Aus der Arbeit von Capel et al. (2007) sind diejenigen Bereiche des MLH1 Promotors bekannt, deren Methylierung mit fehlender MLH1 Expression korreliert. Die entsprechende Untersuchung der 7 MSI Zelllinien ohne nachweisbares MLH1 Protein wurde zweimal unabhängig voneinander durchgeführt.

Dabei wurden deckungsgleiche Ergebnisse erhalten, die in Abbildung 3.5 aus einer der beiden Analysen stammend dargestellt sind. Nur bei einer der untersuchten Zelllinien, nämlich der auf tumorigene Leukozyten zurückzuführenden Linie KCL-22, liegt eine Promotormethylierung vor.

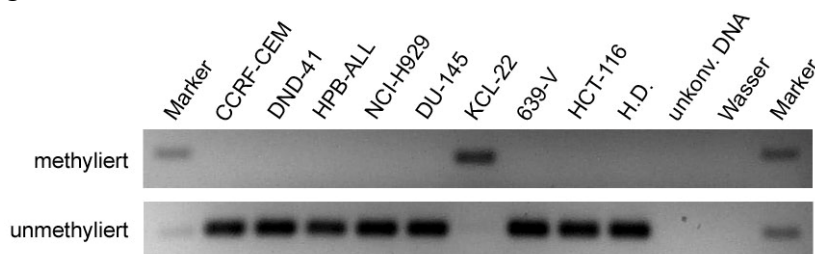


Abb. 3.5: Der MLH1 Promotor ist in nur einer der untersuchten Zelllinien methyliert.

Repräsentatives Ergebnis aus der MLH1 Promotormethylierungsanalyse mittels MSP nach Bisulfit Konversion von 7 MSI Zelllinien, die kein MLH1 Protein exprimieren. Oben sind die mit den Primern für methylierte DNA erhaltenen Produkte aufgetragen, unten die mit den Primern für unmethylierte DNA erhaltenen. Als Negativkontrollen waren DNAs von HCT-116 sowie aus der Blutprobe eines gesunden Donors (H.D.) mit konvertiert und analysiert worden. Mit der unkonvertierten DNA (unkonv. DNA) als Template wird die Spezifität der Primer für konvertierte DNA nachgewiesen. Eine Promotormethylierung konnte nur für die Zelllinie KCL-22 nachgewiesen werden.

Das epigenetisch bedingte Abschalten der MLH1 Genexpression stellt unter den untersuchten MSI Zelllinien die Ausnahme dar. Eine häufigere Ursache für das Fehlen des MLH1 Proteins in diesen Zelllinien ist demzufolge in Mutationen zu suchen, die sich auf die Genexpression bzw. die Proteinstabilität auswirken.

3.1.4. Zusammenfassung der Untersuchungen zu den Ursachen für MSI in Zelllinien

Die aus den Analysen zu den MMR Proteinen, den MSH Transkripten und dem Methylierungszustand des MLH1 Promotors in humanen MSI Zelllinien gewonnenen Daten sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst.

Tab. 3.2: Übersicht über die von den MSI Zelllinien gewonnenen Daten.

Aufgeführt sind die aus der Protein-, der Transkript- und der Promotormethylierungsanalyse von den 41 untersuchten MSI Zelllinien erhaltenen Ergebnisse. Pr. Protein; Tr. Transkript; Prom. Promotor; + Protein bzw. Transkript ohne Variationen nachweisbar; - Protein bzw. Transkript nicht nachweisbar oder nur mit Variationen; m methyliert; u unmethyliert; n.d. nicht durchgeführt.

Zelllinie	MSH2		MSH3		MSH6		MLH1	
	Pr.	Tr.	Pr.	Tr.	Pr.	Tr.	Pr.	Prom.
T-Zellen	CCRF-CEM	+	+	+	+	+	-	u
	CML-T1	-	-	-	-	+	+	n.d.
	DND-41	+	+	+	+	+	-	u
	HPB-ALL	+	+	+	+	-	-	u
	HSB-2	-	-	-	+	-	-	n.d.
	JURKAT	-	+	-	+	-	+	n.d.
	KARPAS-45	+	+	+	+	+	+	n.d.
	MOLT-17	-	-	-	+	-	+	n.d.
	SUP-T1	-	+	-	+	-	+	n.d.
B-Zellen	DG-75	-	-	-	+	-	+	n.d.
	MHH-PREB-1	-	-	-	+	-	+	n.d.
	NALM-1	+	+	+	+	+	+	n.d.
	NALM-6	-	+	-	+	-	+	n.d.
	NCI-H929	+	+	+	+	+	-	u
	RS4;11	+	+	+	+	+	+	n.d.
	TANOUE	+	+	+	+	+	+	n.d.
Darm	CL-34	+	+	+	+	+	+	n.d.
	DLD-1	+	+	+	+	-	+	n.d.
	HCT-15	+	+	+	+	-	+	n.d.
	LOVO	-	-	-	+	-	+	n.d.
Lunge	DV-90	+	+	+	+	+	+	n.d.
	H-1339	+	+	-	-	+	+	n.d.
	H-1963	+	+	+	+	+	+	n.d.
	HCC-15	+	+	+	+	+	+	n.d.
Sonstige Gewebe	AN3-CA	+	+	+	+	+	+	n.d.
	MFE-296	+	+	+	+	+	+	n.d.
	MFE-319	+	+	+	+	+	+	n.d.
	22RV1	-	-	-	+	-	+	n.d.
	DU-145	+	+	+	+	+	-	u
	LNCAP	-	+	-	+	-	+	n.d.
	CTV-1	-	-	-	+	-	-	n.d.
	KCL-22	+	+	+	+	+	-	m
	COLO-704	+	+	+	+	+	+	n.d.
	EFO-27	-	+	-	+	-	+	n.d.
	639-V	+	+	+	+	-	-	u
	BFTC-905	+	+	+	+	+	+	n.d.
	23132/87	+	+	+	+	+	+	n.d.
	MT-3	+	+	+	+	+	+	n.d.
	CAL-72	+	+	+	+	+	+	n.d.
	LN-405	+	+	+	+	+	+	n.d.
	RH-18	+	+	+	+	+	+	n.d.
Gesunder Spender		+	+	+	+	+	+	u
fehlend absolut:		13	8	14	2	17	4	7
fehlend relativ [%]:		32	20	34	5	41	10	17
präsent absolut:		28	33	27	39	24	32	34
präsent relativ [%]:		68	80	66	95	59	90	83

In 56 % der untersuchten Linien sind ein oder mehrere der untersuchten MMR Proteine nicht nachweisbar (vgl. 3.1.1.). Dabei kann die Abwesenheit eines bestimmten Proteins nicht zwingend mit dem Fehlen oder einer Größenveränderung des entsprechenden Transkripts erklärt werden (Tab. 3.2). Während MSH2, MSH3 und MSH6 auf Proteinebene in jeweils etwa gleich vielen Zelllinien fehlen, zeigt sich auf Transkriptebeine vor allem MSH2 als in seiner vollen Länge nicht nachweisbar (Tab. 3.2). Ein Abschalten der Genexpression über Promotormethylierung spielt für die Gene MSH2, MSH3 und MSH6 (vgl. 3.1.2.1.) gar keine und für das Gen MLH1 (vgl. 3.1.3.) eine untergeordnete Rolle.

3.2. Alternative Transkripte für MSH2, MSH3 und MSH6 in MMR profizienten Zellen

Der zweite Abschnitt des Ergebnisteils beschäftigt sich mit den MMR Komponenten MSH2, MSH3 und MSH6 in MMR profizienten Zellen. Dabei konzentrieren sich die Untersuchungen auf den Nachweis und die Charakterisierung von Transkriptvarianten für die Gene MSH2, MSH3 und MSH6 sowie auf den Nachweis entsprechender Proteinisoformen.

3.2.1. Nachweis von Transkriptvarianten für MSH2, MSH3 und MSH6

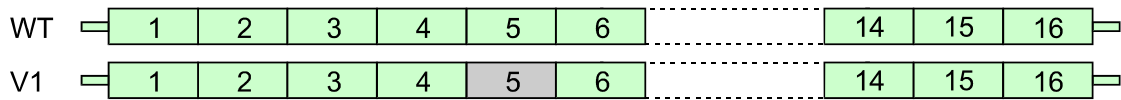
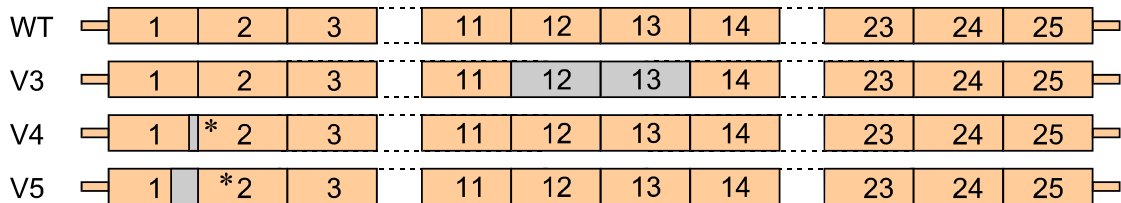
Alternatives Spleißen führt vermutlich in mehr als 70 % aller humanen Gene zu isoformen Transkripten und Proteinen (Johnson et al. 2003). Im Rahmen der Transkriptanalyse (vgl. 3.1.2.) wurden für MSH3 zwei Fragmente abweichender Größe zusätzlich zu dem entsprechenden Wildtypfragment detektiert (Abb. 3.4a). Ebenso wurde ein abweichendes Fragment für MSH6 gefunden (Abb. 3.3). Diese Fragmente wurden aus jeweils drei verschiedenen Zelllinien isoliert (DV-90, NALM-6, SUP-T1 für MSH3; MHH-PREB-1, SUP-T1, TANOUE für MSH6) und anschließend sequenziert. Dabei zeigte sich, dass die Größenvariation je Fragment auf dem Fehlen eines spezifischen Sequenzbereichs beruhte. Da die Varianten außerdem in der gesunden Zelllinie MRC-5 gefunden werden, liegt die Vermutung nahe, dass es sich um Produkte eines alternativen Spleißprozesses handelt.

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob weitere Transkriptvarianten von den Genen MSH2, MSH3 und MSH6 existieren. Dabei sollten Varianten nachgewiesen werden, die im Vergleich zu den Wildtyptranskripten in geringen Mengen vorliegen und deshalb nach RT-PCR nicht direkt über Kapillarelektrophorese bzw. Agarose-Gelelektrophorese detektierbar

sind. Um diese alternativen Transkripte nachweisen zu können, wurden mittels RT-PCR je Transkript zwei Fragmente amplifiziert (vgl. 3.3.1.), direkt in den pGEM[®]-T-Easy Vektor (Promega) kloniert und in *E. coli* eingebracht. Anschließend wurden die Plasmide aus jeweils 20 Bakterienklonen über charakteristische Schnitte daraufhin untersucht, ob sie das jeweilige Amplikon enthalten und ob Größenvariationen detektierbar sind. Wenn letzteres der Fall war, so wurden die entsprechenden Plasmide sequenziert. Auf diese Weise konnten die häufigsten alternativ gespleißten Transkripte detektiert werden, genaugenommen diejenigen, die gegenüber dem Wildtyptranskript in einem Verhältnis von 1/20 oder mehr vorlagen.

Für den Nachweis weiterer Transkriptvarianten wurden die MMR profizienten Zelllinien FE-PD, L-1236, L-591 und MV-4;11 untersucht. Darüber hinaus wurde überprüft, ob die in den Zelllinien gefundenen Transkriptvarianten auch im Blut eines gesunden Spenders nachweisbar sind. Damit sollte gezeigt werden, dass die gefundenen Varianten nicht auf einem individuellen genetischen Hintergrund basieren und dass es sich dabei nicht um Artefakte handelt, die nur in immortalisierten Zelllinien auftreten. Transkriptvarianten, die sowohl in mindestens einer der MMR profizienten Zelllinien als auch im Blut des gesunden Spenders nachgewiesen werden konnten, wurden als physiologische Produkte alternativen Spleißens eingestuft. Diese Kriterien erfüllten die Transkriptvarianten MSH2-V1, MSH3-V3, MSH3-V4, MSH3-V5 und MSH6-V3. In Abbildung 3.6 sind diese alternativ gespleißten Transkripte im Vergleich mit den Wildtyptranskripten schematisch dargestellt.

Der einzigen für MSH2 gefundenen Variante, MSH2-V1, fehlt das Exon 5 (150 bp). Für MSH3 wurden drei Varianten gefunden, wobei MSH3-V3 die Exons 12 und 13 (195 bp) fehlen. MSH3-V4 und MSH3-V5 fehlen 86 bzw. 151 bp aus dem 3'-Bereich von Exon 1. Bei beiden Varianten resultiert daraus eine Verschiebung des Leserasters sowie ein früher Translationsabbruch nach 45 bzw. 41 Aminosäuren. Bei der Variante MSH6-V3 fehlen der gesamte codierende Bereich des ersten Exons sowie die direkt davor liegenden beiden Nukleotide aus der untranslatierten Region (262 bp). Im 5'-Bereich von Exon 2 findet sich ab Position 298 bezüglich des eigentlichen Translationsstarts ein ATG, das als alternatives Startcodon für die Translation in Frage kommt.

MSH2:**MSH3:****MSH6:****Abb. 3.6: Transkripte für MSH2, MSH3 und MSH6.**

Dargestellt sind Schemazeichnungen zum Vergleich der Wildtyptranskripte mit den jeweiligen Transkriptvarianten. Dabei sind die einzelnen Exons durchnummeriert. Graue Flächen markieren fehlende Sequenzbereiche. Bei den Varianten MSH3-V4 und MSH3-V5 führt das Fehlen von 86 bzw. 151 bp zu einer Verschiebung des Leserasters. Diese resultiert in einem vorzeitigen Translationsabbruch nach 45 bzw. 41 Aminosäuren, der durch einen Asteriskus im jeweiligen Exon 2 symbolisiert wird. Der alternative Translationsstart der Transkriptvariante MSH6-V3 auf Position 298 (als Nukleotid 1 wird das A des eigentlichen Startcodons gezählt) in Exon 2 ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Anhand der Sequenzen wurde ermittelt, welche Donoren und Akzeptoren den jeweiligen Spleißvorgängen zugrundeliegen. Bei allen Varianten außer MSH3-V5 liegt das häufigste Spleißdonor/-akzeptor Paar GU-AG vor. MSH3-V5 resultiert aus der Nutzung des selteneren Spleißdonor/-akzeptor Paares GC-AG (Burset et al. 2000). Daher können alle vorgestellten Transkriptvarianten auf Spleißprozesse zurückgeführt werden, die regulären Mechanismen folgen.

3.2.2. Authentizität der Sequenzen

Im Rahmen der Sequenzierung der den MSH2, MSH3 und MSH6 Transkripten entsprechenden cDNAs wurden beim Abgleich mit den Datenbanksequenzen für die Wildtyptranskripte von MSH2, MSH3 und MSH6 (NM_000251.1, NM_002439.2 bzw. NM_000179.1) Austausche einzelner Basen detektiert. Dabei handelt es sich entweder um auf genomischer Ebene manifestierte Veränderungen oder um Fehler, die bei der Amplifikation der einzelnen Fragmente entstanden sind. Zwecks funktionaler Studien sollten die cDNAs in

einen Expressionsvektor kloniert und die entsprechenden Proteine exprimiert werden (vgl. 3.3.). Daher wurden sämtliche Basenaustausche einschließlich der aus ihnen resultierenden Aminosäureaustausche (Tab. 3.3) auf ihre theoretischen Auswirkungen auf die Proteinfunktion hin überprüft.

Tab. 3.3: Übersicht über die Basenaustausche in den für die Klonierungen verwendeten cDNAs.

Aufgeführt sind die Basenaustausche und die daraus resultierenden Aminosäureaustausche der den MSH Transkripten entsprechenden cDNAs, die zwecks Funktionsanalysen umklont und exprimiert werden sollten. Der Abgleich erfolgte anhand der Datenbanksequenzen NM_000251.1 bzw. ENST00000233146 für MSH2, NM_002439.2 bzw. ENST00000389285 für MSH3 und NM_000179.1 bzw. ENST00000234420 für MSH6. Die Positionen der Basenaustausche, der die jeweilige Datenbanksequenz zugrundeliegt, beziehen sich stets auf den Translationsstart (das A des Startcodons wird als Nukleotid 1 gezählt). SNP *single nucleotide polymorphism*; s stille Mutation.

	Basenaustausche	Aminosäureaustausche
MSH2-WT	A433G	I145V
	T938C	F313S
	A1739G	E580G
	A2631G	s
MSH2-V1	A113G	D38G
	C359T	A120V
	A400G	I134V
	T411C	s
	A612C	s
	T621C	s
MSH3-WT (Allel 3)	A2631G	s
	C107A	S36Y
	A235G	I79V (SNP)
	T1035C	s
	A1623G	s
	A1732G	K578E
	T2312C	V771A
	A2954G	D985G
MSH3-V3 (Allel 3)	G3133A	A1045T (SNP)
	C107A	S36Y
	A235G	I79V (SNP)
	G693A	s (SNP)
	A1005G	s
	A2954G	D985G
MSH3-V4	G3133A	A1045T (SNP)
MSH3-V5	-	-
MSH6-WT	A186C	s (SNP)
	T3178C	s
	T3306C	s
MSH6-V3	A764G	E255G
	A978G	s
	T3178C	s
	T3306C	s

Bei einigen Veränderungen handelt es sich gemäß der Ensembl Datenbank um bekannte *single nucleotide polymorphisms* (SNPs), die die Funktionen des entsprechenden Proteins nicht beeinträchtigen. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die übrigen

Basenaustausche bislang unveröffentlichte SNPs darstellen. Im Falle der Aminosäureaustausche, die nicht mit publizierten SNPs in Zusammenhang stehen, kann über den von Obmolova et al. (2000) angestellten Struktur- und Sequenzvergleich der Proteine MutS aus *Thermus aquaticus*, MSH2 bis MSH6 aus Hefe sowie humanem MSH2, MSH3 und MSH6 weitgehend ausgeschlossen werden, dass von diesen Substitutionen konservierte und damit in ihrer Funktion bedeutende Bereiche von den Austauschen betroffen sind. Die einzige Ausnahme stellt der in MSH3-WT und MSH3-V3 gefundene Austausch D985G dar. Er ist in einem stark konservierten Bereich lokalisiert, der an der strukturellen Integrität sowie an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt ist. Aus den unter 3.3.4.1. dargestellten Ergebnissen geht hervor, dass dieser Aminosäureaustausch die Dimerisierung von MSH3-WT und MSH3-V3 mit MSH2 nicht beeinträchtigt.

3.2.3. Proteinisoformen für MSH2, MSH3 und MSH6

Nachdem für MSH2, MSH3 und MSH6 jeweils mindestens zwei verschiedene Transkripte detektiert worden waren, sollte überprüft werden, ob auch verschiedene Proteinisoformen existieren.

Mit MSH3 spezifischen Antikörpern konnten in einigen Zelllysaten mittels Western Blot Analysen zwei Banden detektiert werden, die aufgrund ihres relativen Laufverhaltens zueinander den Proteinisoformen MSH3-WT und MSH3-V3 zugeordnet werden können. Das relative Laufverhalten von rekombinant exprimierten und an YFP gekoppelten MSH3-WT und MSH3-V3 Proteinen (vgl. 3.3.) zueinander ist vergleichbar und unterstützt diese Annahme (Abb. 3.7).

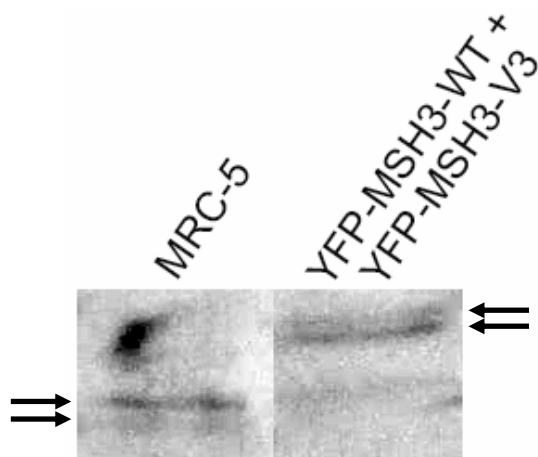


Abb. 3.7: Detektion von Doppelbanden mit dem MSH3 spezifischen Antikörper.

Westernblot von der Zelllinie MRC-5 und von 293 Zellen, die YFP-MSH3-WT bzw. YFP-MSH3-V3 stabil exprimieren. Aufgetragen wurden jeweils Lysatmengen, die einer Zellzahl von $5 \cdot 10^4$ entsprechen. Dazu wurden die Lysate der YFP-MSH3-WT bzw. YFP-MSH3-V3 exprimierenden 293 Zellen vorab 1:1 miteinander vermischt. Der Nachweis erfolgte mit einem polyklonalen MSH3 spezifischen Antikörper. Die detektierten Doppelbanden sind mit Pfeilen markiert.

Für MSH2 und MSH6 konnten mittels Western Blot Analysen keine Proteinisoformen detektiert werden. Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass die Proteinvarianten nur in geringen Konzentrationen vorliegen, die die Nachweisgrenze der Western Blot Technik unterschreiten. Darüber hinaus sind die molekularen Größen des Wildtypproteins und der entsprechenden Proteinvariante jeweils sehr ähnlich, weshalb die Proteinisofomen mit der verwendeten Methode kaum voneinander getrennt werden können.

Daher wurde zum Nachweis von Proteinisoformen für MSH2 und MSH6 die Technik der 2D-Gelelektrophorese angewendet. Im Gegensatz zum Western Blot hat sie den Vorteil, dass etwa 400fach mehr Gesamtprotein untersucht werden kann und dass eine Auftrennung sowohl über die Isoelektrische Punkte (IEPs) als auch die molekulare Größe der Proteine erfolgt. Dies ermöglicht den Nachweis schwach konzentrierter Proteine sowie die Auftrennung von Proteinen mit sehr ähnlicher molekularer Größe, sofern deren IEPs sich ausreichend voneinander unterscheiden. Sowohl für MSH2-WT und MSH2-V1 als auch für MSH6-WT und MSH6-V3 trifft dies mit IEPs von 5,6 und 5,9 bzw. 6,5 und 6,1 zu, die anhand der Sequenzen bioinformatisch ermittelt wurden (http://scansite.mit.edu/calc_mw_pi.html).

Untersucht wurden die MSS Zelllinie HT-1080 und als Kontrolle die MSI Zelllinie LOVO, die eine homozygote Deletionsmutation innerhalb des MSH2 Gens trägt (Umar et al. 1994) und in der mittels Western Blot Analyse keines der drei MSH Proteine nachgewiesen werden konnte. Aus Abbildung 3.8 geht hervor, dass in HT-1080 Zellen für MSH2 und MSH6 jeweils zwei Spots detektiert werden können. Diese Ergebnisse zeigen, dass für MSH2 und MSH6 jeweils zwei Proteinisoformen existieren. Aufgrund der weitgehenden Übereinstimmung von experimentell ermittelten und theoretisch berechneten IEPs kann es sich dabei um die Wildtypproteine und die den Transkriptvarianten MSH2-V1 und MSH6-V3 entsprechenden Proteinvarianten handeln.

Strukturdaten zufolge fehlt bei der Proteinvariante MSH2-V1 ein Bereich, dem zwar keine spezielle Funktion zugeordnet werden kann, der aber für die Gesamtstruktur von Bedeutung ist. Bei MSH3-V3 ist ein Bereich betroffen, der vermutlich an Interaktionen verschiedener Domänen innerhalb eines Proteins beteiligt ist. Den Peptiden MSH3-V4 und MSH3-V5 fehlen sämtliche bislang beschriebenen Domänen (Obmolova et al. 2000). Jedoch enthält die Sequenz von MSH3-V4 ein PCNA-Bindemotiv (PIP-Box), was für die Sequenz von MSH3-V5 nicht gilt. Bei der Proteinvariante MSH6-V3 ist keine der bekannten Domänen

betroffen. Durch das Fehlen der N-terminalen Aminosäuren fehlt dieser Variante aber eine PIP-Box, worin sie sich vom Wildtypprotein unterscheidet (Kleczkowska et al. 2001).

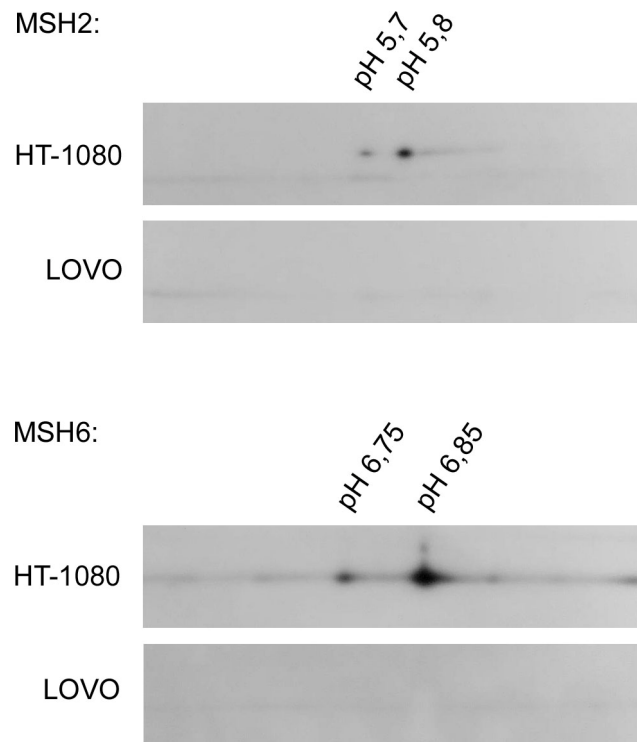


Abb. 3.8: Endogene Proteinisoformen für MSH2 und MSH6.

Dargestellt sind die Ergebnisse einer 2D-Gelelektrophorese mit Proteinen aus den Zelllinien HT-1080 und LOVO. Eingesetzt wurden jeweils 500 µg Gesamtprotein. Im Anschluss an die Isoelektrische Fokussierung (IEF) und die Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Detektion erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen MSH2 und MSH6. In HT-1080 Zellen wurden mit beiden Antikörpern jeweils zwei Spots nachgewiesen. In LOVO Zellen hingegen wurde erwartungsgemäß kein MSH Protein detektiert. Angegeben sind die experimentell ermittelten IEPs der detektierten Proteine.

3.2.4. Übersicht über die alternativen MSH Transkripte in MMR profizienten Zellen

Insgesamt wurden acht verschiedene Transkripte für die Gene MSH2, MSH3 und MSH6 in MMR profizienten Zelllinien sowie im Blut eines gesunden Spenders nachgewiesen. Dabei handelt es sich um die drei Wildtyptranskripte, sowie um die fünf in Abbildung 3.6 dargestellten Varianten MSH2-V1, MSH3-V3, MSH3-V4, MSH3-V5 und MSH6-V3, die auf alternative Spleißprozesse zurückzuführen sind. Auf Proteinebene wurden für MSH2, MSH3 und MSH6 jeweils zwei Isoformen detektiert (Abb. 3.7; Abb. 3.8). Dabei handelt es sich sehr

wahrscheinlich um die Wildtypproteine sowie um die den Transkriptvarianten MSH2-V1, MSH3-V3 und MSH6-V3 entsprechenden Proteinvarianten.

3.3. Expression rekombinanter MSH Proteine

Die den Wildtyptranskripten und Transkriptvarianten von MSH2, MSH3 und MSH6 entsprechenden Proteine sollten mithilfe reverser Genetik untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden die entsprechenden cDNAs zunächst kloniert, und zwar 3' von für die Fluoreszenzproteine GFP, CFP oder YFP codierenden Sequenzen. Anschließend erfolgte die stabile Expression von N-terminalen Fusionsproteinen in humanen Zelllinien. Über die spezifische Kopplung mit einem Fluoreszenzprotein kann die räumliche und zeitliche Verteilung des zu untersuchenden Proteins in lebenden Zellen ermittelt werden. Darüber hinaus ermöglicht die Fusion die Anwendung eines standardisierten Verfahrens zur Isolierung der Fusionsproteine im Rahmen von Co-Immunpräzipitationen mittels eines GFP spezifischen Antikörpers.

3.3.1 Klonierungsstrategie

Um die von den Transkriptvarianten codierten Proteine funktional charakterisieren zu können, sollten die entsprechenden cDNAs nach der Sequenzierung aus dem pGEM[®]-T-Easy Vektor (Promega) in einen Expressionsvektor umklont werden. Zu diesem Zweck waren für die im Rahmen der Suche nach Transkriptvarianten durchgeführten RT-PCRs spezielle Primer entworfen worden. Da die codierenden Sequenzen der MSH2, MSH3 und MSH6 Transkripte mit 2805, 3384 bzw. 4077 bp relativ lang sind, wurden sie in jeweils zwei Teilen amplifiziert, sequenziert und kloniert, um die Arbeiten zu erleichtern. Die Besonderheiten der verwendeten Primer sind in Abbildung 3.9 dargestellt.

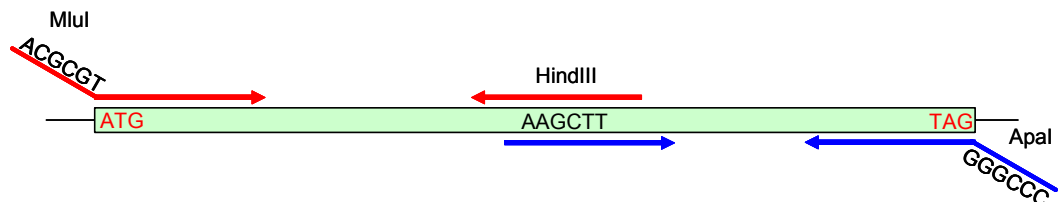


Abb. 3.9: Amplifikation des MSH2 Transkripts.

Um das anschließende Klonieren in Expressionsvektoren zu erleichtern, wurden die den verschiedenen MSH Transkripten entsprechenden cDNAs mit speziellen Primern amplifiziert. Da die Amplifikation in jeweils zwei Fragmenten erfolgte, wurden jeweils vier Primer benötigt, die beispielhaft für MSH2 dargestellt sind. Die beiden äußeren Primer wurden mit 5' überhängenden Sequenzen versehen, die von spezifischen Restriktionsenzymen erkannt werden. Die beiden in der Mitte der Transkriptsequenzen bindenden Primer wurden so entworfen, dass sie an einem Bereich binden, der die Erkennungssequenz eines weiteren Restriktionsenzym enthält. Die für die Klonierung von MSH2 bedeutenden Sequenzen sowie die verwendeten Restriktionsenzyme sind angegeben. Um MSH6-V3 exprimieren zu können, wurde für den 5'-Bereich ein Vorwärtsprimer entworfen, der ab dem alternativen Startcodon ab Position 298 bezüglich des eigentlichen Translationsstarts bindet. Auch dieser Primer wurde mit einer 5' überhängenden Sequenz versehen, die von einem spezifischen Restriktionsenzym erkannt wird.

3.3.2. Expressionsvektoren

Grundlage für die funktionalen Analysen an den verschiedenen MSH Proteinisoformen mittels reverser Genetik war die Klonierung der entsprechenden cDNAs in Expressionsvektoren. Als Ausgangsvektor für die Klonierungen wurde ein Derivat des bicistronischen Expressionssystems SBC-1 und SBC-2 verwendet (Dirks et al. 1993). Der daraus entwickelte bicistronische Vektor zeichnet sich dadurch aus, dass die für zwei verschiedene Proteine codierenden Sequenzen unter der Kontrolle eines einzigen Promotors stehen. Daher entsteht ein einzelnes Transkript, das für beide Proteine codiert, wobei die Translation des vom ersten Cistron codierten Proteins über die Cap-Struktur und die des vom zweiten Cistron codierten Proteins über eine *internal ribosomal entry site* (IRES) vermittelt wird. Beide Proteine werden in einem konstanten Verhältnis zueinander exprimiert, wobei die Expression des vom ersten Cistron codierten Proteins stets dominiert (Dirks et al. 1993). Dieser bicistronische Vektor war von C. Mielke (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) modifiziert und unter dem Namen pMC-EGFPP-N (Abb. 3.10a) zur Verfügung gestellt worden.

Die den MSH Transkripten entsprechenden cDNAs wurden in den bicistronischen Ausgangsvektor pMC-EGFPP-N kloniert. Dessen erstes Cistron enthält bereits die für EGFP codierende Sequenz, so dass nach Klonieren der spezifischen cDNA in das gleiche Cistron ein N-terminales Fusionsprotein exprimiert wird. Vom zweiten Cistron wird das Markerprotein

Puromycin N-Acetyltransferase (PAC) codiert (Abb. 3.10b). Über die gekoppelte Transkription ist die Expression des zu untersuchenden Fusionsproteins in den unter Selektionsdruck überlebenden Zellen weitgehend sichergestellt. Dieses System ermöglicht selbst die Expression von schwer in die Physiologie der Zellen eingreifenden Fremdprodukten, da die in sogenannten Kotransfer-Experimenten von zwei Plasmiden beobachteten epigenetischen Modifikationen des Fremdgens nicht toleriert werden.

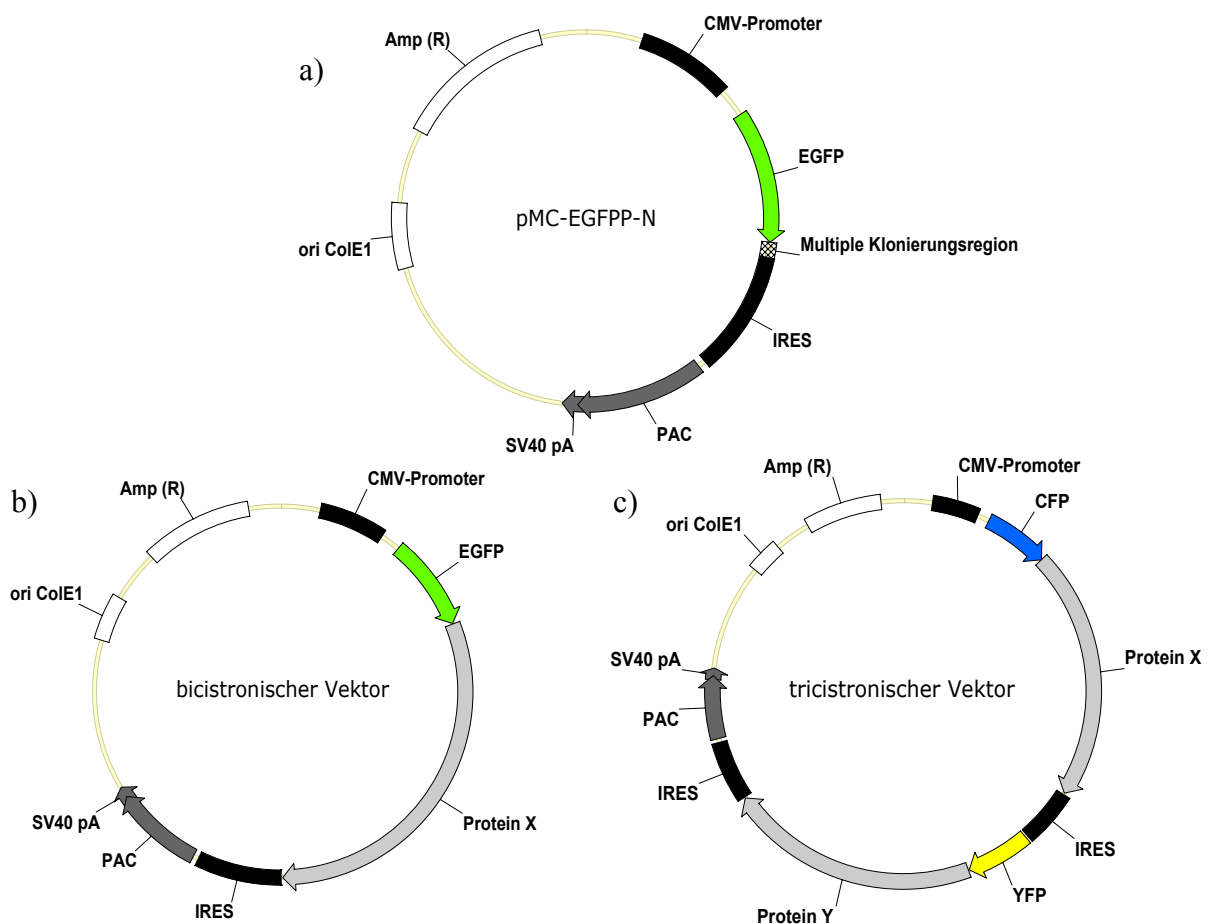


Abb. 3.10: Verwendete Expressionsvektoren.

a) Der Ausgangsvektor pMC-EGFP-N wurde von C. Mielke (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) zur Verfügung gestellt. Die Transkription des *enhanced green fluorescent proteins* (EGFP) und der Puromycin N-Acetyltransferase (PAC) steht unter der Kontrolle eines einzelnen CMV Promotors. Die Translation von dem gemeinsamen Transkript wird über eine Methylguanosin-Cap-Struktur bzw. über eine *internal ribosomal entry site* (IRES) vermittelt. 3' von der für EGFP codierenden Sequenz liegt eine multiple Klonierungsregion.

b) Bicistronischer Expressionsvektor. Die für Protein X codierende Sequenz wurde in die multiple Klonierungsregion von pMC-EGFP-N inkliniert. Das Stopp-Codon der für EGFP codierenden Sequenz wurde zerstört, weshalb der Vektor die Expression eines Fusionsproteins aus Protein X mit einem N-terminal angehängten EGFP vermittelt.

c) Tricistronischer Expressionsvektor. Der bicistronische Vektor wurde um eine Sequenzeinheit erweitert, die für *yellow fluorescent protein* (YFP) fusioniert mit Protein Y codiert und die Bildung einer weiteren IRES Struktur vermittelt. Die für EGFP codierende Sequenz wurde gegen die für *cyan fluorescent protein* (CFP) codierende ausgetauscht. Dieser Vektor ermöglicht die unter der Kontrolle eines gemeinsamen CMV Promotors stehende Expression von drei Proteinen, nämlich von den Fusionsproteinen CFP-X und YFP-Y sowie von PAC.

Um weiterführende Analysen, vor allem zu *in vivo* Protein-Protein-Interaktionen durchführen zu können, wurde der bestehende bicistronische Vektor zu einem tricistronischen Vektor erweitert (Abb. 3.10c). Dabei codiert das dritte Cistron für den Selektionsmarker, während die beiden vorderen Cistrons die Expression verschiedener Kombinationen von MSH Proteinen ermöglichen, unter anderem von MutSa und MutSβ. Statt mit EGFP werden die MSH Proteine ausgehend von diesem Vektor mit CFP bzw. YFP fusioniert exprimiert. Die Verwendung dieser beiden Fluoreszenzproteine ermöglicht den *in vivo* Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen über den Fluoreszenz-Resonanzenergie-Transfer (FRET).

Der tricistronische Vektor wurde außerdem verwendet, um die verschiedenen MSH Proteine in Kombination mit dem *proliferation controlling nuclear antigen* (PCNA) zu exprimieren. Dieses Protein kann als Zellzyklusmarker eingesetzt werden. PCNA ist essentiell für die DNA Synthese und reichert sich während der S-Phase an sogenannten Replikationsbrennpunkten an der DNA an. Ist PCNA mit einem Fluoreszenzprotein fusioniert, so können in der S-Phase befindliche Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie anhand charakteristischer Spots identifiziert werden. Die tricistronischen Vektoren mit PCNA sollten den Nachweis zellzyklusabhängiger Aktivitäten der MMR Proteine erleichtern. Darüber hinaus wurde in der Literatur beschrieben, dass PCNA in den Prozess der MMR involviert ist und dass es mit den Proteinen MSH3 und MSH6 interagiert (Kleczkowska et al. 2001). Ob entsprechende Interaktionen auch mit dem MSH2 Protein oder den Proteinvarianten von MSH2, MSH3 bzw. MSH6 stattfinden, sollte mithilfe der FRET Technik *in vivo* nachgewiesen werden.

Alles in allem erfolgte die Klonierung der den acht verschiedenen Transkripten für MSH2, MSH3 und MSH6 entsprechenden cDNAs in insgesamt 27 Expressionsvektoren, die in Tabelle 3.4 detailliert aufgeführt sind. Diese Vektoren ermöglichen die stabile Expression der entsprechenden Proteine in eukaryotischen Zellen.

Tab 3.4: Übersicht über die Vektoren zur stabilen Expression der MSH Proteine.

Aufgelistet sind die bi- und tricistronischen Expressionsvektoren unter Angabe der von den einzelnen Cistrons codierten Proteine. Aufgeführt sind außerdem die Untersuchungen, die im Rahmen der Vorliegenden Arbeit mithilfe der jeweiligen Vektoren durchgeführt wurden. Zusätzlich zu den 27 Vektoren zur stabilen Expression der MSH Proteine wurden 4 Kontrollvektoren kloniert.

Vektor	1. Cistron	2. Cistron	3. Cistron	Anwendung
pMC-G-MSH2-WT-P	GFP-MSH2-WT	PAC	-	Lokalisation Bindeverhalten
pMC-G-MSH2-V1-P	GFP-MSH2-V1	PAC	-	
pMC-G-MSH3-WT-P	GFP-MSH3-WT	PAC	-	
pMC-G-MSH3-V3-P	GFP-MSH3-V3	PAC	-	
pMC-G-MSH3-V4-P	GFP-MSH3-V4	PAC	-	
pMC-G-MSH3-V5-P	GFP-MSH3-V5	PAC	-	
pMC-G-MSH6-WT-P	GFP-MSH6-WT	PAC	-	
pMC-G-MSH6-V3-P	GFP-MSH6-V3	PAC	-	
pMC-C-PCNA-Y-MSH2-WT-P	CFP-PCNA	YFP-MSH2-WT	PAC	Lokalisation Co-Lokalisation mit PCNA (FRET)
pMC-C-PCNA-Y-MSH2-V1-P	CFP-PCNA	YFP-MSH2-V1	PAC	
pMC-C-PCNA-Y-MSH3-WT-P	CFP-PCNA	YFP-MSH3-WT	PAC	
pMC-C-PCNA-Y-MSH3-V3-P	CFP-PCNA	YFP-MSH3-V3	PAC	
pMC-C-PCNA-Y-MSH3-V4-P	CFP-PCNA	YFP-MSH3-V4	PAC	
pMC-C-PCNA-Y-MSH3-V5-P	CFP-PCNA	YFP-MSH3-V5	PAC	
pMC-C-PCNA-Y-MSH6-WT-P	CFP-PCNA	YFP-MSH6-WT	PAC	
pMC-C-PCNA-Y-MSH6-V3-P	CFP-PCNA	YFP-MSH6-V3	PAC	
pMC-C-MSH2-WT-Y-MSH2-V1-P	CFP-MSH2-WT	YFP-MSH2-V1	PAC	Lokalisation (FRET)
pMC-C-MSH2-WT-Y-MSH3-WT-P	CFP-MSH2-WT	YFP-MSH3-WT	PAC	
pMC-C-MSH2-WT-Y-MSH3-V3-P	CFP-MSH2-WT	YFP-MSH3-V3	PAC	
pMC-C-MSH2-WT-Y-MSH3-V4-P	CFP-MSH2-WT	YFP-MSH3-V4	PAC	
pMC-C-MSH2-WT-Y-MSH3-V5-P	CFP-MSH2-WT	YFP-MSH3-V5	PAC	
pMC-C-MSH2-WT-Y-MSH6-WT-P	CFP-MSH2-WT	YFP-MSH6-WT	PAC	
pMC-C-MSH2-WT-Y-MSH6-V3-P	CFP-MSH2-WT	YFP-MSH6-V3	PAC	
pMC-C-MSH2-V1-Y-MSH3-WT-P	CFP-MSH2-V1	YFP-MSH3-WT	PAC	Lokalisation (FRET)
pMC-C-MSH2-V1-Y-MSH3-V3-P	CFP-MSH2-V1	YFP-MSH3-V3	PAC	
pMC-C-MSH2-V1-Y-MSH6-WT-P	CFP-MSH2-V1	YFP-MSH6-WT	PAC	
pMC-C-MSH2-V1-Y-MSH6-V3-P	CFP-MSH2-V1	YFP-MSH6-V3	PAC	
pMC-EGFP-N	GFP	PAC	-	Kontrollen
pMC-C-MSH6-P	CFP-MSH6-P	PAC	-	
pMC-Y-MSH6-P	YFP-MSH6-P	PAC	-	
pMC-CFP-YFP-P	CFP	YFP	PAC	

3.3.3. Stabile Expression der fluoreszenzmarkierten MSH Proteine

Zur Durchführung funktionaler Analysen an den verschiedenen MSH Proteinisoformen wurden die unter 3.3.2. vorgestellten Expressionsvektoren stabil in humane Zelllinien transfiziert. Die Isolierung von Einzelklonen sollte sicherstellen, dass die Zellpopulationen genetisch einheitlich sind. Damit sollte ein Vergleich einzelner Zellen miteinander ermöglicht werden, weil Unterschiede in den Zahlen der inserierten Kopien sowie in den Orten der Insertion ausgeschlossen werden können.

3.3.3.1. Transfektion und Etablierung von Einzelklonen

In einem ersten Ansatz sollten MSI Zelllinien mit bekannten Defiziten in der Expression bestimmter MMR Proteine (Tab. 3.2) mit MMR Proteinen rekonstituiert werden. Auf diese Weise sollten von endogenem Hintergrund freie Modellsysteme erschaffen werden, um einen direkten Vergleich der Auswirkungen von fehlender und vorhandener MMR in ansonsten genetisch identischen Zellen zu ermöglichen. Von der Rekonstitution zu erwartende Effekte waren die Wiederherstellung der Fehlpaarungsreparatur, der MMR abhängigen Zellzykluskontrolle sowie der MMR abhängigen Induktion von Apoptose.

Die Transfektion der MSH2 defizienten Zelllinie LOVO, der MSH3 defizienten Linie HCT-116 und der MSH6 defizienten Linie DLD-1 erfolgte sowohl mit den bicistronischen Vektoren als auch mit tricistronischen, die für MutS α bzw. MutS β codieren (Tab. 3.4). Gegenüber den Transfektionen mit Kontrollvektoren, die für reines GFP bzw. CFP und YFP codieren, fielen die Klonzahlen sehr niedrig aus. Meist wurden gar keine oder nur solche Klone erhalten, die maximal drei Wochen überlebten. Zudem waren die Proliferationsgeschwindigkeiten deutlich herabgesetzt. Eine stabile Expression der MSH Proteine in den MMR defizienten Zelllinien LOVO, HCT-116 und DLD-1 konnte nicht etabliert werden. Auch in der Literatur wurden nur zwei Hinweise auf die Existenz einer mit MSH6 stabil transfizierten humanen Zelllinie gefunden (Lettieri et al. 1999; Kleczkowska et al. 2001), und keine einzige Publikation über die stabile Expression von rekombinantem MSH2 oder MSH3, was als Indiz für die Schwierigkeiten bei der Überexpression dieser Proteine gewertet werden kann.

In einem zweiten Ansatz wurden zwei für reverse Genetik etablierte Zelllinien transfiziert, die sich durch besonders hohe Transfektionseffizienzen auszeichnen, nämlich die Linien 293 und HT-1080. Da diese Linien die Proteine MSH2, MSH3 und MSH6 endogen exprimieren, sollten über die Transfektion eine Überexpression dieser Proteine erreicht und deren Effekte untersucht werden. Im Vergleich zu den Transfektionen mit den Kontrollvektoren waren die Klonzahlen bei den übrigen Transfektionen wieder deutlich geringer. Trotzdem ergaben alle Transfektionsansätze mehrere Klone. Man kann davon ausgehen, dass dies auf der insgesamt höheren Transfektionseffizienz in den verwendeten Zelllinien beruht.

Nach 18tägiger Selektion wurden die Klone einzeln in Mikrotiterplatten umgesetzt. Sobald die Klone subkonfluent waren, wurde jeweils die Hälfte der Zellen in eine zweite

Mikrotiterplatte umgesetzt, die eine Kopie der ersten darstellte. Am Fluoreszenzmikroskop wurden die Fluoreszenzintensitäten der Einzelklone ausgewertet. Da eine hohe Fluoreszenzintensität für die Detektierbarkeit in späteren Experimenten von Vorteil ist, wurden von den aus einer Transfektion hervorgegangenen Einzelklonen jeweils zwei mit der stärksten Fluoreszenz expandiert und in den folgenden Untersuchungen verwendet.

Je Expressionskonstrukt wurden zwei Einzelklone in 293 und zwei in HT-1080 Zellen etabliert. Damit können sämtliche Ergebnisse in unabhängigen Einzelklonen reproduziert werden. Insgesamt steht eine Zahl von 124 Einzelklonen für weitere Untersuchungen zur Verfügung.

3.3.3.2. Beeinflussung der Expression endogener MSH Proteine

Zusätzlich zur Überprüfung der Fluoreszenz wurden die rekombinanten Proteine mit spezifischen Antikörpern gegen MSH2, MSH3, MSH6 oder PCNA und GFP nachgewiesen. Dabei fiel eine Veränderung des Expressionsmusters der endogenen MSH Proteine als Konsequenz aus der Expression der rekombinanten MSH Proteine auf. In Abbildung 3.11 sind diese Expressionsmuster dargestellt.

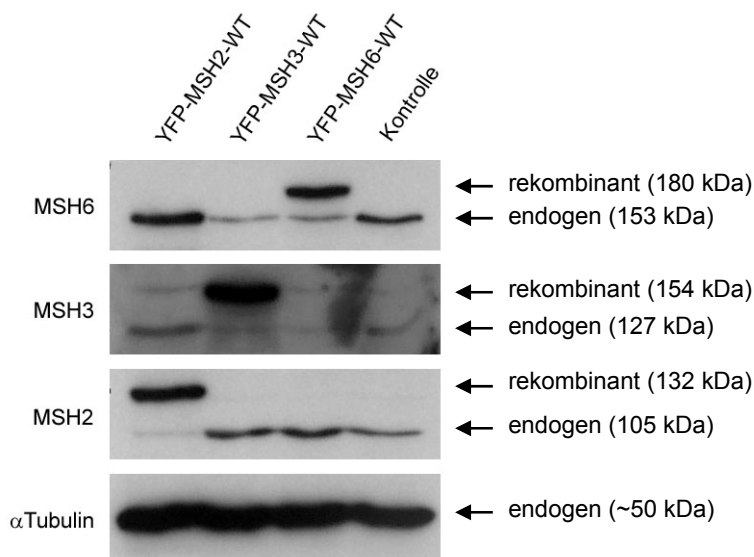


Abb. 3.11: Einfluss der rekombinanten Proteine auf die Expression der endogenen MSH Proteine.

Aufgetragen wurde jeweils Lysat aus $5 \cdot 10^4$ HT-1080 Zellen, die die Wildtypproteine MSH2, MSH3 oder MSH6 mit YFP fusioniert exprimieren. Eine entsprechende Lysatmenge von unbehandelten HT-1080 Zellen dient als Kontrolle. Die Detektion der Proteine erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen MSH2, MSH3, MSH6 und αTubulin. In allen drei transfizierten Zelllinien ist eine Herunterregulation der Expression desjenigen MSH Proteins zu beobachten, das rekombinant überexprimiert wird. In der YFP-MSH2-WT exprimierenden Zelllinie ist darüber hinaus die Menge an endogenem MSH6 und MSH3 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle deutlich erhöht.

Für unbehandelte HT-1080 Zellen ergibt sich ein Muster aus zwei starken Banden für MSH2 und MSH6 und einer schwächeren Bande für MSH3. Im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen lieferte der MSH2-WT exprimierende Klon deutlich stärkere Banden für MSH3 und MSH6, wohingegen das Signal für endogenes MSH2 kaum detektierbar war. Von Lysaten aus Zellen, die rekombinantes MSH3 oder MSH6 exprimieren, wurden für endogenes MSH3 und MSH6 schwächere Signale erhalten als in der Kontrolle. Die Signale für endogenes MSH2 hingegen waren etwas stärker.

Vor allem die von dem MSH2 exprimierenden Einzelklon erhaltenen Daten weisen auf eine Stabilisierung der Proteine MSH3 und MSH6 durch ihren Bindungspartner MSH2 hin, da sie beide als Folge der Überexpression von MSH2 angereichert werden. Damit deutet sich eine Interaktion der rekombinanten mit den endogenen MSH Proteinen an. Die Abnahme der Signalstärke für endogenes MSH2 weist auf eine aktive Herunterregulierung hin. Dies kann als Indiz dafür gewertet werden, dass die Überschreitung einer bestimmten Konzentration an intrazellulärem MutS α und MutS β nicht toleriert werden kann. Ebenso lassen sich die schwächeren Signale für endogenes MSH3 und MSH6 in den Zellen deuten, die rekombinantes MSH3 oder MSH6 exprimieren. Das in diesen Zellen leicht verstärkte Signal für MSH2 kann als Hinweis auf einen umgekehrt stabilisierenden Effekt von MSH2 durch MSH3 und MSH6 gedeutet werden. Aus diesen Überlegungen ergibt sich, dass auch die Fusionsproteine zu Gunsten des Erhalts eines stöchiometrischen Verhältnisses von MSH2, MSH3 und MSH6 sowie zur Begrenzung der MutS α und MutS β Konzentration einer gewissen Regulation unterliegen. Daher sind keine maximalen Fluoreszenzintensitäten zu erwarten. Die Beeinflussung der Expression der endogenen MSH Proteine durch die rekombinanten Fusionsproteine weist auf deren Funktionalität hin.

3.3.4. Protein-Protein-Interaktionen

3.3.4.1. Co-Immunpräzipitationen

Um zu überprüfen, ob die rekombinanten Proteine zur Bildung der Heterodimere MutS α und MutS β mit endogenen Proteinen befähigt sind, wurden Co-Immunpräzipitationen durch-

geführt. Dazu wurden die mit den bicistronischen Vektoren transfizierten 293 Zellen verwendet, die jeweils eins der acht verschiedenen MSH Proteine exprimieren (Tab. 3.4). Als Kontrollen wurden unbehandelte 293 Zellen mitgeführt. Da die transfizierten Zellen an GFP gekoppeltes MSH Protein synthetisieren, konnten die Fusionsproteine in einem standardisierten Verfahren über einen GFP spezifischen Antikörper aus den entsprechenden Lysaten extrahiert werden. Dabei wurde unter Konditionen gearbeitet, die den Erhalt von Protein-Protein-Interaktionen gewährleisten. Anschließend wurden das immunpräzipitierte Protein und seine Bindungspartner über Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) aufgetrennt und mittels Western Blot Analyse nachgewiesen. Die Detektion der co-immunpräzipitierten Proteine erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen MSH2, MSH3 und MSH6.

In Abbildung 3.12 sind die Ergebnisse dargestellt. Die rekombinanten Proteine konnten in allen Fällen nachgewiesen werden, mit Ausnahme der nur 45 bzw. 41 Aminosäuren umfassenden Peptide MSH3-V4 und MSH3-V5. Diese konnten mit dem zur Verfügung stehenden MSH3 spezifischen Antikörper nicht detektiert werden. Aus den nicht transfizierten 293 Zellen wurde kein endogenes MSH Protein präzipitiert, wodurch die Spezifität der Co-Immunpräzipitation mit dem Antikörper gegen GFP bestätigt wurde.

Über GFP-MSH2-WT ließen sich die endogenen Proteine MSH3 und MSH6 mit präzipitieren, während über GFP-MSH2-V1 keiner der endogenen Partner gefällt wurde (Abb. 3.12a). Endogenes MSH2, nicht aber endogenes MSH3 oder MSH6, konnte in den Extrakten der Zellen detektiert werden, die GFP-MSH3-WT exprimieren. Im Gegensatz dazu wurde keines der endogenen MSH Proteine über mit GFP fusioniertes MSH3-V3, MSH3-V4 oder MSH3-V5 mit ausgefällt (Abb. 3.12b). In den Co-Immunpräzipitaten von GFP-MSH6-WT und GFP-MSH6-V3 exprimierenden Zellen konnte kein endogenes MSH3 nachgewiesen werden. Neben den Banden für rekombinantes MSH6 und endogenes MSH2 konnte eine dritte Bande detektiert werden, bei der es sich aufgrund der Größe vermutlich um endogenes MSH6 handelt (Abb. 3.12c). Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass MSH6 neben Heterodimeren auch Homodimere bildet oder dass zwei MutS α Heterodimere ein Tetramer bilden können. Da bakterielles MutS Protein in Abhängigkeit von seiner Konzentration Tetramere bildet, ist es naheliegend, dass sich auch zwei MutS α Komplexe zu einem Tetramer zusammenlagern können (Bjornson et al. 2003).

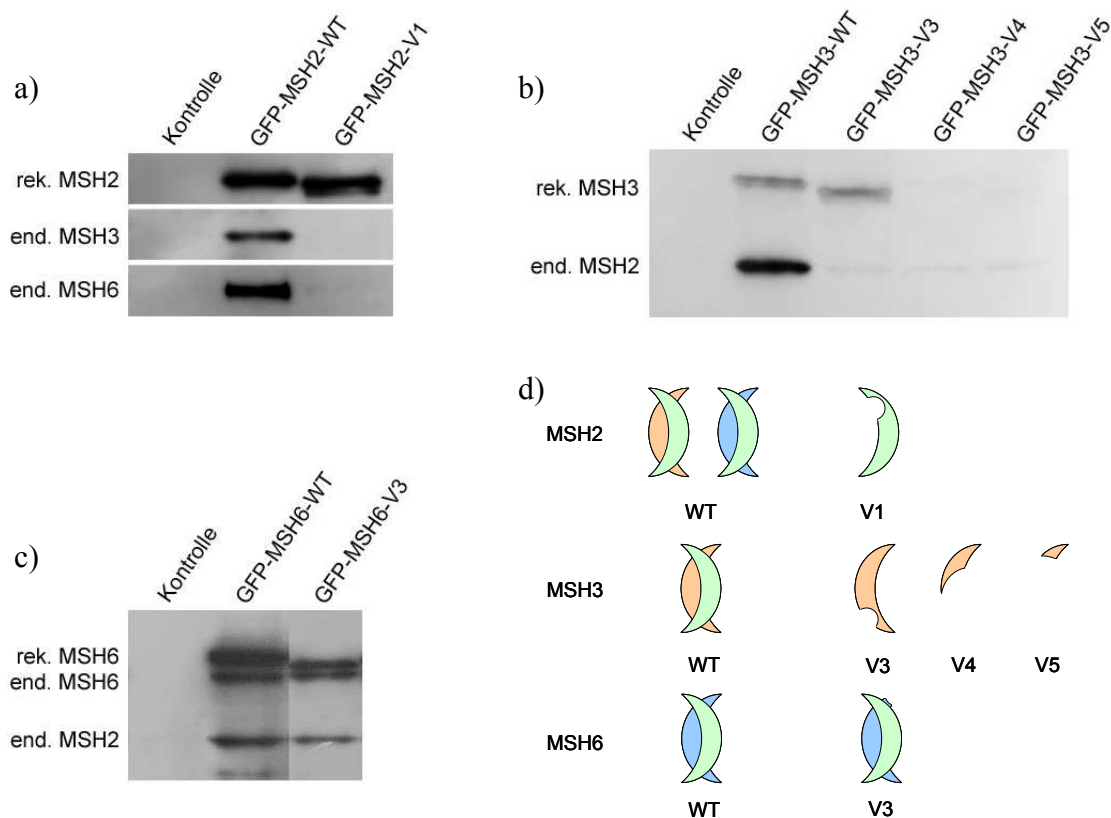


Abb. 3.12: Heterodimerbildung von rekombinanten mit endogenen MSH Proteinen.

Die Co-Immunpräzipitation erfolgte in allen Fällen mit einem GFP spezifischen Antikörper. Untersucht wurden stets die Kernlysate mit Ausnahme der MSH2-V1 exprimierenden Zellen, von denen die cytoplasmatische Fraktion analysiert wurde. Je Lane sind Präzipitate aus $3 \cdot 10^6$ 293 Zellen aufgetragen. Die Detektion wurde mit Antikörpern gegen MSH2, MSH3 und MSH6 durchgeführt. Zum Nachweis der Spezifität wurden bei allen Co-Immunpräzipitationen nicht transfizierte 293 Zellen als Kontrolle mitgeführt. end. endogen; rek. rekombinant.

a) Rekombinantes MSH2-WT bildet MutS α und MutS β mit endogenem MSH6 bzw. MSH3. Rekombinantes MSH2-V1 bindet keinen der endogenen Partner.

b) Nur rekombinantes MSH3-WT bindet endogenes MSH2 und kann damit zur Bildung von MutS β beitragen.

c) Rekombinantes MSH6-WT und MSH6-V3 binden endogenes MSH2 und können sich daher an dem Komplex MutS α beteiligen. Die in beiden Fällen zusätzlich detektierten Banden entsprechen vermutlich endogenem MSH6 und können als Hinweis auf die Existenz von MutS α Tetrameren gedeutet werden.

d) Schematische Darstellung der MSH Proteine und ihrer Varianten sowie Übersicht über ihr Bindeverhalten untereinander. Die Wildtypproteine sind in Form von Halbmonden dargestellt (grün - MSH2; rot - MSH3; blau - MSH6), die jeweiligen Proteinvarianten als entsprechend veränderte Halbmonde. Nur die Wildtypproteine und die Proteinvariante MSH6-V3 bilden Heterodimere mit den entsprechenden Partnern.

Eine Übersicht über die Ergebnisse aus den Co-Immunpräzipitationen ist in Abbildung 3.12d dargestellt. Die rekombinanten Proteine MSH2-WT, MSH3-WT, MSH6-WT und MSH6-V3 bilden zusammen mit den entsprechenden endogenen Proteinen die Heterodimere MutS α bzw. MutS β . Dass sie sich in Bezug auf die Heterodimerisierung wie die nativen Proteine verhalten, kann als Hinweis auf ihre Funktionalität in der MMR gedeutet werden. Im Gegensatz dazu sind die rekombinanten Proteine MSH2-V1, MSH3-V3, MSH3-V4 und

MSH3-V5 nicht an der Bildung entsprechender Heterodimere beteiligt. Daher kann davon ausgegangen werden, dass diese Proteinvarianten nicht in die Bindung und Korrektur von Replikationsfehlern involviert sind. Ob sie andere Funktionen ausüben, bleibt zu klären.

3.3.4.2. FRET Analysen

Zum *in vivo* Nachweis für die Bildung von MutS α und MutS β Komplexen sowie für Interaktionen dieser beiden Komplexe mit PCNA sollte der Fluoreszenz-Resonanzenergie-Transfer (FRET) Anwendung finden. Mit dieser Technik kann die räumliche Nähe von Proteinen nachgewiesen werden, sofern sie 1-10 nm beträgt. Diese Nähe wird in der Regel nur von direkt miteinander interagierenden Proteinen erreicht. Die Technik beruht auf der Anregung eines Fluoreszenzproteins mit Licht von spezifischer Wellenlänge. Bei entsprechender räumlicher Nähe kann die von dem angeregten Molekül emittierte Energie direkt auf ein zweites Fluoreszenzprotein mit einem langwelligeren Absorptions- und Emissionsspektrum übertragen werden. Dieses Protein setzt die es anregende Energie in eine Fluoreszenz definierter Wellenlänge um. Als Konsequenz von Protein-Protein-Interaktionen kann nach Anregung des ersten Fluoreszenzproteins also nicht dessen Fluoreszenz sondern die eines zweiten Fluoreszenzproteins nachgewiesen werden. Damit dieser Energietransfer stattfinden kann, muss sich das Emissions- bzw. Absorptionsspektrum der verwendeten Fluoreszenzproteine teilweise überlappen. Diese Voraussetzung wird unter anderem durch die Verwendung von CFP und YFP erfüllt.

Eine Einschränkung ist, dass unter Verwendung von Fusionsproteinen nicht jede Interaktion nachgewiesen werden kann. Insbesondere bei der Untersuchung sehr großer Proteine können die Fluorochrome trotz einer Protein-Protein-Interaktion weiter als 10 nm voneinander entfernt liegen. Darüber hinaus erfordert der Energietransfer das Vorliegen der Fluoreszenzproteine in einer Mindestkonzentration, um die Nachweisgrenze nicht zu unterschreiten.

Die *in vivo* Untersuchung der Interaktionen der MSH Proteine untereinander sowie mit PCNA wurde in Zusammenarbeit mit C. Mielke an der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf durchgeführt. Sie sollte mit den transfizierten Zellen stattfinden, die paarweise mit CFP und YFP fusionierte Proteine exprimieren können (Tab. 3.4). Aufgrund der relativ schwachen Expression der Fusionsproteine reichte die von der Gesamtheit der CFP Moleküle emittierte

Fluoreszenz selbst bei optimaler Anregung nicht aus, um die YFP Moleküle so stark anzuregen, dass deren Fluoreszenz messbar gewesen wäre. Eine Erhöhung der Anregungsenergie über das Optimum hinaus führt zu einer Verringerung der Detektierbarkeit durch das Ausbleichen der Fluorophore. Da die Fluoreszenzintensitäten in den Einzelklonen durchweg zu gering waren, konnten die FRET Analysen nicht mit Erfolg durchgeführt werden.

3.3.5. Lokalisation

In Bezug auf das Protein MSH2 bestehen in der Literatur Widersprüche zur zellulären Lokalisation. So wurde dieses Protein in einigen Arbeiten ausschließlich im Zellkern nachgewiesen (Castrilli et al. 2001; Belloni et al. 1999), während Christmann & Kaina (2000), Marquez et al. (2004) und Schroering et al. (2007) MSH2 auch im Cytoplasma detektieren konnten. Die vorliegenden Untersuchungen wurden durchgeführt, um diesen Widerspruch zu klären und um über die jeweilige Lokalisation Hinweise auf die Funktionen der verschiedenen Proteinisoformen zu erhalten (vgl. 4.7. und 4.9.).

Die Detektion der Fusionsproteine erfolgte über das sogenannte *live-cell imaging* und wurde in Zusammenarbeit mit C. Mielke an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt. Diese nicht-invasive Methode zur Untersuchung lebender Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie erlaubt die Aufklärung molekularer Vorgänge vor dem Hintergrund natürlicher, zellulärer Prozesse. Eine bestmögliche Simulation der natürlichen Bedingungen wurde durch eine den Objektisch umschließende Kammer gewährleistet, in der während der Untersuchungen eine konstante Temperatur von 37 °C aufrechterhalten wurde. Außerdem wurde in gepuffertem Medium mit stabilem pH-Wert gearbeitet. Die Zuordnung der detektierten Fusionsproteine zu bestimmten Zellkompartimenten erfolgte über den Vergleich mit parallel erstellten Phasenkontrastaufnahmen.

Die Aufnahmen wurden zunächst unter Verwendung der bicistronischen Vektoren erstellt und anschließend unter Verwendung sämtlicher zur Verfügung stehender tricistronischer Vektoren wiederholt (Tab. 3.4). Dabei war die Lokalisation der einzelnen Proteine unabhängig vom verwendeten Expressionsvektor stets identisch. Dass mit dem Filter für YFP und CFP jeweils nur spezifische Fluoreszenz aufgenommen wird, zeigen die Aufnahmen von den Zellen, die über einen bicistronischen Vektor entweder CFP-MSH6 oder YFP-MSH6 exprimieren (Abb. 3.13, Aufnahmen I-K). Um außerdem abschätzen zu können, ob eine bestimmte

Verteilung über die Fusion mit dem jeweiligen Fluoreszenzprotein vermittelt wurde, wurden Aufnahmen von Zellen gemacht, die die Fluoreszenzproteine ohne Fusionspartner exprimieren (Abb. 3.13, Aufnahme L).

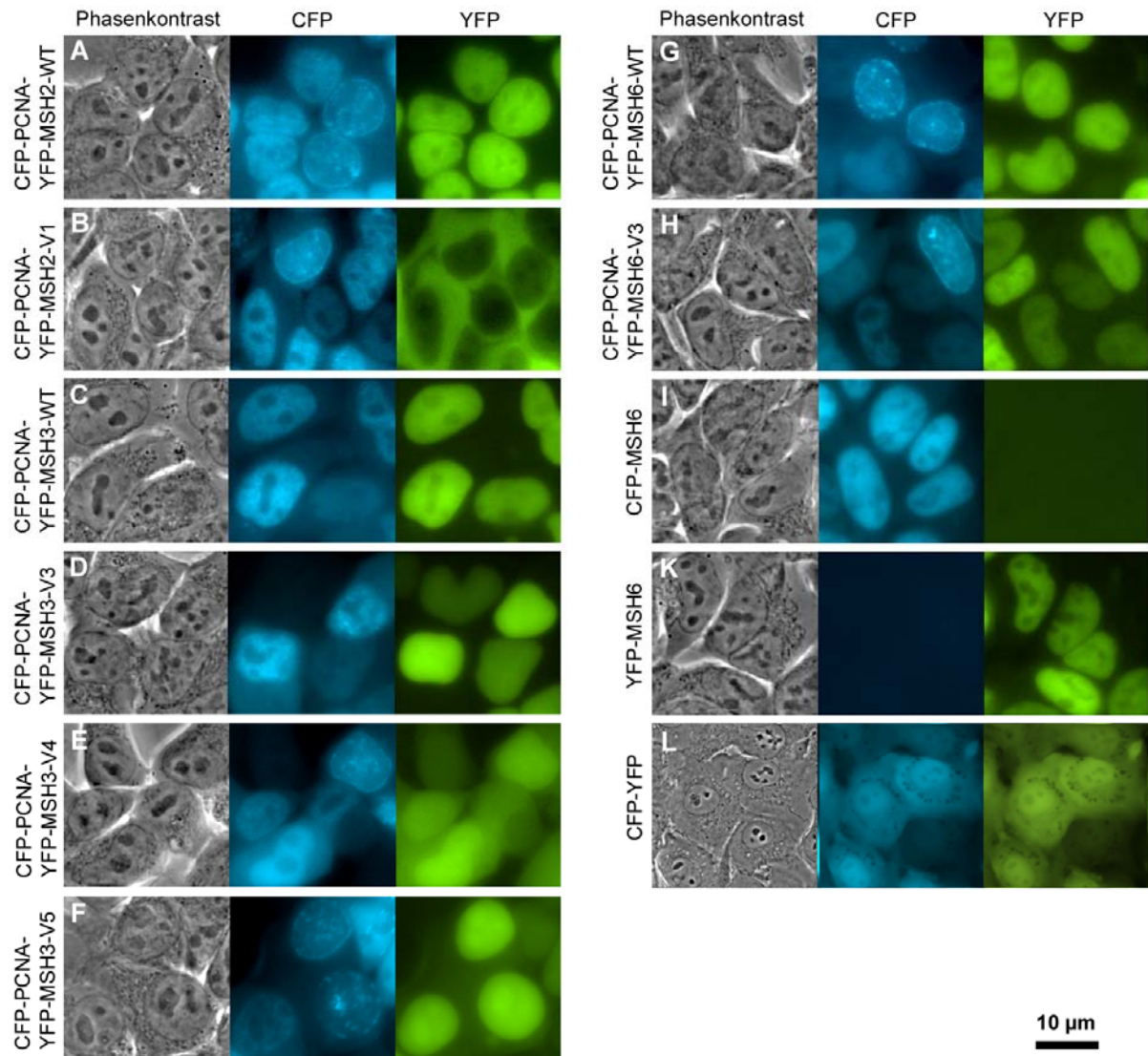


Abb. 3.13: Intrazelluläre Lokalisation der MSH2, MSH3 und MSH6 Wildtypproteine und ihrer Varianten.

Dargestellt sind mittels *live-cell imaging* erhaltene Aufnahmen von 293 Einzelklonen, die CFP-PCNA sowie die verschiedenen mit YFP fusionierten MSH Proteine exprimieren (A-H). Von links nach rechts sind jeweils Phasenkontrastaufnahmen, Epifluoreszenzaufnahmen mit einem CFP spezifischen Filter und Epifluoreszenzaufnahmen mit einem YFP spezifischen Filter dargestellt. Die Spezifität der Filter wurde über die nur CFP-MSH6 oder YFP-MSH6 exprimierenden Einzelklone überprüft (I-K). Die Aufnahmen der unspezifisch verteilten Fluoreszenzproteine ohne Fusionspartner (L) bestätigen die von diesen unabhängige spezifische Lokalisation der Fusionsproteine. PCNA ist im Zellkern lokalisiert, das gleiche gilt für die MSH Wildtypproteine und die meisten der Varianten. Eine Ausnahme stellt das Protein YFP-MSH2-V1 dar, das ausschließlich im Cytoplasma nachgewiesen werden kann (B). Die Bilder wurden in Zusammenarbeit mit C. Mielke an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf aufgenommen.

Die in Abbildung 3.13 dargestellten Aufnahmen wurden von 293 Zellen erhalten, die CFP-PCNA und jeweils ein YFP-MSH Protein exprimieren. Dabei fungiert die von CFP-PCNA erhaltene Fluoreszenz als Markierung des Zellkerns. Die Aufnahmen machen deutlich, dass bis auf MSH2-V1, MSH3-V4 und MSH3-V5 sämtliche Proteine ausschließlich im Kern lokalisiert sind. MSH3-V5 ist zwar über die gesamte Zelle verteilt, weist aber eine deutliche Konzentration im Kern auf (Abb. 3.13, Aufnahme F), wohingegen MSH3-V4 gleichmäßig über Kern und Cytoplasma verteilt ist (Abb. 3.13, Aufnahme E). Den stärksten Gegensatz liefert MSH2-V1, da dieses Protein ausschließlich im Cytoplasma nachzuweisen ist (Abb. 3.13, Aufnahme B).

Für verschiedene Proteine konnte ein besonderes Phänomen beobachtet werden, das in den vorliegenden Aufnahmen am besten anhand von MSH3-V3 und MSH6-V3 zu sehen ist (Abb. 3.13, Aufnahmen D bzw. H). Hier zeigen sich zwischen einzelnen Zellen deutliche Unterschiede in den Fluoreszenzintensitäten. Dies ist erstaunlich, da es sich bei den Zellpopulationen um genetisch völlig einheitliche Einzelklone handelt. Aus diesem Grund sind die unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten als starke Hinweise auf eine Regulation der rekombinanten Proteine zu deuten. Da deren Expression unter der Kontrolle eines konstitutiv exprimierenden Promoters steht, muss diese Regulation auf posttranskriptioneller Ebene, wahrscheinlich auf Proteinebene stattfinden.

Aus den Aufnahmen von der CFP und YFP exprimierenden Kontrollzelllinie geht hervor, dass die Fluoreszenzproteine unspezifisch über Kern und Cytoplasma verteilt sind (Abb. 3.13, Aufnahme L). Eine Beeinflussung der spezifischen Lokalisation der MSH Proteine durch die Fusion mit YFP ist daher weitgehend auszuschließen. Lediglich auf die Verteilung der mit 45 bzw. 41 Aminosäuren sehr kurzen Peptide MSH3-V4 und MSH3-V5 mag YFP aufgrund seiner etwa fünffachen molekularen Größe Einfluss nehmen. Von daher besteht die Möglichkeit, dass die Peptide ohne Einfluss von YFP im Zellkern lokalisiert wären. Einen Hinweis darauf liefert die nukleäre Konzentration von MSH3-V5.

Da MSH2-V1 ausschließlich außerhalb des Kerns lokalisiert ist, hat es keinen Kontakt zur nukleären DNA, weshalb eine direkte Beteiligung dieses Proteins an der MMR auszuschließen ist. Ob es eine Funktion ausübt, bleibt zu klären.

3.3.6. Co-Lokalisation von MSH Proteinen und PCNA nach UVA Bestrahlung

Im Allgemeinen reagieren Zellen auf UV Schäden mit Zellzyklusarrest und je nach Ausmaß des Schadens mit Reparatur oder Apoptose. Eine Beteiligung von MMR Proteinen ist sowohl für die Zellzykluskontrolle als auch für die Induktion des programmierten Zelltods beschrieben. So nimmt MSH2 Einfluss auf den S-Phase Arrest (van Oosten et al. 2005) und die Induktion von Apoptose nach UVB Bestrahlung (Young et al. 2004). Außerdem ist bekannt, dass MutSa DNA mit UV induzierten Schäden wie Cyclobutan Pyrimidin Dimeren (CPDs), [6-4] Photoproducten und 8-Oxoguaninen binden kann, jedoch konnte eine erhöhte Affinität zu solchen Schäden nur gezeigt werden, wenn gegenüber der geschädigten Base eine fehlgepaarte Base eingefügt war (Wang et al. 1999; Mazurek et al. 2002). Demzufolge ist unklar, ob *in vivo* eine Reparatur von UV Schäden erfolgt oder ob die DNA zunächst repliziert wird und erst auf UV Schäden zurückzuführende Basenfehlpaarungen gebunden und korrigiert werden. Über PCNA ist bekannt, dass es über Nukleotid-Excisionsreparatur (NER) und Basen-Excisionsreparatur (BER) in die Reparatur von UV induzierten DNA Schäden involviert ist (Übersicht in Moldovan et al. 2007). Mit dem im Folgenden beschriebenen Experiment sollte überprüft werden, ob eine Beteiligung von MSH2 an der Zellreaktion auf UVA Schäden über eine Co-Lokalisation mit PCNA gezeigt werden kann. Auf die gleiche Weise sollten die Bindungspartner MSH3 und MSH6 sowie die Proteinvarianten MSH2-V1, MSH3-V3, MSH3-V4, MSH3-V5 und MSH6-V3 untersucht werden. Schließlich sollte die Kinetik ermittelt werden, mit der eine Anreicherung von PCNA und MMR Proteinen an DNA nach UVA Bestrahlung stattfindet.

Untersuchungen zur Beteiligung von MMR an der Zellantwort auf UV induzierte DNA Schäden wurden bereits mehrfach unter Verwendung von UVB Licht durchgeführt (Ichikawa et al. 2000; Yoshino et al. 2002; Young et al. 2004; van Oosten et al. 2005). Lange Zeit wurde angenommen, dass UVA bei der Entstehung von Hautkrebs nur eine geringfügige Rolle spielt, unter anderem, weil es im Gegensatz zu UVB keinen Sonnenbrand verursacht (Übersicht in Setlow 1974). Im Vergleich zu UVB ist der Anteil an UVA in dem auf der Erde eintreffenden Sonnenlicht jedoch etwa 20fach höher und im Gegensatz zu UVB dringt es bis in die Basalschicht der Haut ein. Da das aus dieser Hautschicht hervorgehende Basalzellkarzinom der häufigste Hautkrebs beim Menschen ist, wird dem langwelligeren UVA Licht inzwischen eine größere Bedeutung bei der Hautkrebsentstehung zugesprochen

(Agar et al. 2004). Daher wurde für die Durchführung der im Folgenden beschriebenen Versuche UVA Licht verwendet.

3.3.6.1. Akkumulation von MSH Proteinen an UVA induzierten DNA Schäden

Die Untersuchung erfolgte an 293 Zellen, die zur Expression von CFP-PCNA sowie einem mit YFP fusionierten MSH Protein befähigt sind (Tab. 3.4). Je Klon wurde mithilfe des Zellzyklusmarkers PCNA eine einzelne in der S-Phase befindliche Zelle bestimmt. In deren Nukleus wurde ein definiertes Areal mit UVA Licht von 364 nm Wellenlänge bestrahlt. Anschließend wurde pro Minute eine Aufnahme von der Zelle gemacht. Die zu markanten Zeitpunkten von den einzelnen Klonen erhaltenen Aufnahmen sind in Abbildung 3.14a dargestellt. Neben CFP-PCNA akkumulieren vor allem YFP-MSH2-WT (Abb. 3.14a, Aufnahme A) und YFP-MSH6-WT (Abb. 3.14a, Aufnahme G) in dem bestrahlten Bereich und etwas schwächer auch YFP-MSH3-WT (Abb. 3.14a, Aufnahme C). Eine Akkumulation der Proteinvarianten von MSH2, MSH3 und MSH6 ist nicht erkennbar.

3.3.6.2. Kinetik der Akkumulation von MSH Proteinen und PCNA

Um die Kinetik der Anreicherung von CFP-PCNA und den mit YFP fusionierten MSH Wildtypproteinen zu verdeutlichen, wurden die Veränderungen der relativen Fluoreszenzintensitäten graphisch dargestellt (Abbildung 3.14b). Dazu wurden je Aufnahme von einem unbehandelten Bereich innerhalb des Nukleus die Fluoreszenzintensitäten von CFP und YFP ermittelt und als Referenz für die entsprechenden Fluoreszenzintensitäten innerhalb des mit UVA bestrahlten Bereichs verwendet. Für die Messung vor der UVA Bestrahlung wurden die sich daraus ergebenden Verhältnisse (Fluoreszenzintensität des zu bestrahlenden Bereichs / Fluoreszenzintensität des Referenzbereichs) dem Wert 1 gleichgesetzt. Die Abnahme der relativen Fluoreszenzintensität auf einen Wert kleiner 1 direkt nach der UVA Bestrahlung liegt in einem Ausbleichen der Fluoreszenzproteine begründet. Die Kinetik der Anreicherung von MSH2-WT, MSH3-WT, MSH6-WT und PCNA verläuft relativ synchron. So ist die Akkumulation ca. 5 min nach UVA Bestrahlung maximal und nimmt anschließend allmählich wieder ab. Nach insgesamt 30 min ist der Ausgangszustand in etwa wieder erreicht.

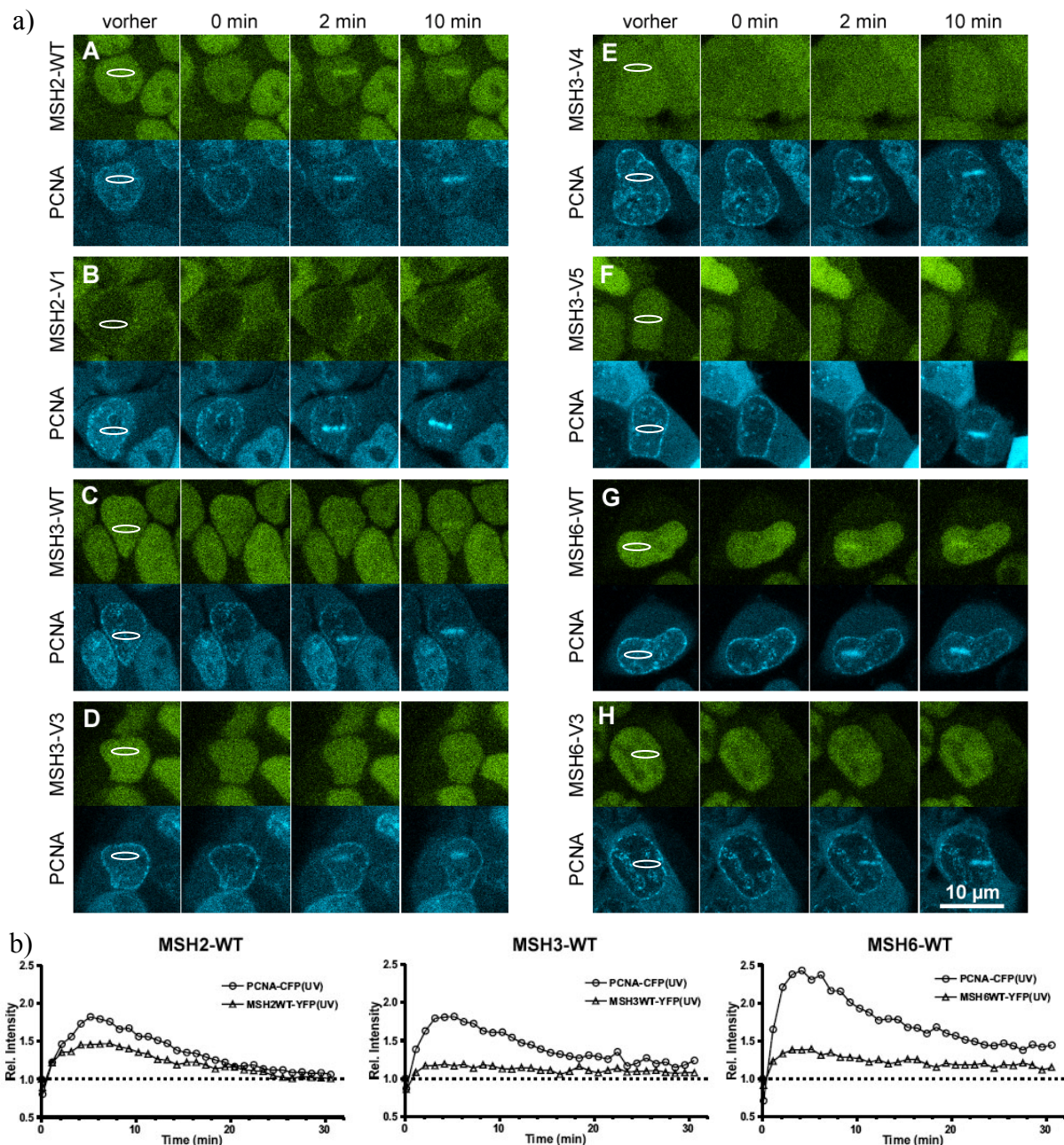


Abb. 3.14: Co-Lokalisation der MSH2, MSH3 und MSH6 Wildtypproteine mit PCNA an UVA induzierten DNA Schäden.

a) Dargestellt sind konfokale Bilder von 293 Einzelklonen, die CFP-PCNA und die verschiedenen mit YFP fusionierten MSH Proteine exprimieren. Die Aufnahmen wurden mittels *live-cell imaging* vor Bestrahlung mit 364 nm UVA Licht, direkt danach sowie 2 und 10 Minuten später gemacht. Der bestrahlte Bereich ist je Aufnahme in der noch nicht bestrahlten Zelle mit einer weißen Umrandung markiert. Darüber hinaus ist der Ort der UVA Bestrahlung über die Akkumulation von PCNA in allen Fällen deutlich zu erkennen. Eine Co-Lokalisation mit PCNA ist für mit YFP fusioniertes MSH2-WT, MSH3-WT und MSH6-WT (A,C und G) zu beobachten.

b) Kinetiken über die Akkumulation von MSH2, MSH3, MSH6 und PCNA an UVA induzierten DNA Schäden. Dargestellt sind die relativen Fluoreszenzintensitäten der bestrahlten Bereiche. Sie wurden je Messpunkt über das Verhältnis der Fluoreszenzintensität in dem bestrahlten Bereich zur Fluoreszenzintensität in einem nicht bestrahlten Referenzbereich des gleichen Zellkerns ermittelt.

Sowohl die Bilder als auch die Kinetiken wurden in Zusammenarbeit mit C. Mielke an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf aufgenommen.

3.3.6.3. Zusammenfassung des UVA Experiments

Alles in allem konnte eine Co-Lokalisation von MSH2-WT, MSH3-WT und MSH6-WT Proteinen in Bereichen UVA induzierter DNA Schäden mit PCNA gezeigt werden. Es ist also davon auszugehen, dass die Heterodimere MutS α und MutS β gemeinsam mit PCNA an einem Prozess beteiligt sind, der als Antwort auf die UVA induzierten Schäden stattfindet. Für die Proteinvarianten konnte eine entsprechende Reaktion nicht nachgewiesen werden. Die Akkumulation erreicht ihr Maximum etwa 5 min nach UVA Bestrahlung und ist innerhalb von etwa 30 min abgeschlossen. Interessanterweise konnten die beschriebenen Reaktionen in der dargestellten Intensität nur in S-Phase Zellen gezeigt werden, wodurch sich eine Abhängigkeit vom Zellzyklus andeutet.

3.3.7. Übersicht über die Expression rekombinanter MSH Proteine

MSH Proteine greifen stark in die Physiologie der Zellen ein. Dies zeigt sich an den vergleichsweise niedrigen Klonzahlen (vgl. 3.3.3.1.) und an der Herunterregulierung der endogenen Proteine in transfizierten Zellen (Abb. 3.11). Eine mögliche Erklärung ist, dass eine bestimmte Konzentration von MMR Proteinen in der Zelle nicht überschritten werden kann. Dies erklärt auch die durchweg schwache Expression der rekombinanten Proteine, aufgrund derer eine Durchführung von FRET Analysen nicht möglich war (vgl. 3.3.4.2.).

Zur Bildung der Heterodimere MutS α und MutS β sind nur die Wildtypproteine von MSH2, MSH3 und MSH6 befähigt sowie die Proteinvariante MSH6-V3 (Abb. 3.12). Daraus lässt sich folgern, dass die vom Exon 5 von MSH2 und von den Exons 12 und 13 von MSH3 codierten Proteinbereiche direkt oder indirekt an der Heterodimerisierung beteiligt sind.

Die Wildtypproteine von MSH2, MSH3 und MSH6 sind im Zellkern lokalisiert, ebenso die Proteinvarianten MSH3-V3 und MSH6-V3. Während die Peptide MSH3-V4 und MSH3-V5 über die gesamte Zelle verteilt sind, ist MSH2-V1 das einzige der untersuchten Proteine, das nur außerhalb des Zellkerns nachgewiesen werden kann (Abb. 3.13). Damit ist eine direkte Beteiligung an der MMR für diese Proteinvariante auszuschließen.

Eine Co-Lokalisation mit PCNA an UVA induzierten DNA Schäden konnte für die Wildtypproteine von MSH2, MSH3 und MSH6 nachgewiesen werden (Abb. 3.14), so dass

eine Beteiligung von MutS α und MutS β an der Zellreaktion auf diese Schäden anzunehmen ist.

Da die rekombinanten Wildtypproteine von MSH2, MSH3 und MSH6 mit den endogenen Bindungspartnern Heterodimere bilden können, eine spezifische intrazelluläre Lokalisation aufweisen und mit PCNA an Orten UVA induzierter DNA Schäden co-lokalisieren, kann ihre Funktionalität als erwiesen angesehen werden. Die entsprechenden Vektoren stellen nützliche Werkzeuge für weitere Funktionsstudien über MMR dar.

3.4. Zellzyklusabhängige Regulation von MMR

In diesem Kapitel soll auf die Regulation der MSH Wildtypproteine eingegangen werden. Zunächst soll ermittelt werden, ob eine zellzyklusabhängige Regulation der Proteine MSH2, MSH3 und/ oder MSH6 mittels Western Blot Analyse nachgewiesen werden kann und in welcher Phase des Zellzyklus die Proteine in maximalen Konzentrationen vorliegen. Anschließend soll für MSH2 überprüft werden, ob die Transkripte MSH2-WT und MSH2-V1 einer zellzyklusabhängigen Regulation unterliegen. Der Erfolg der Zellzyklussynchronisation mittels Colcemid und Aphidicolin wurde bei allen Versuchsansätzen anhand von FACS Analysen überprüft. In Abbildung 3.15 ist ein repräsentatives Ergebnis dargestellt.

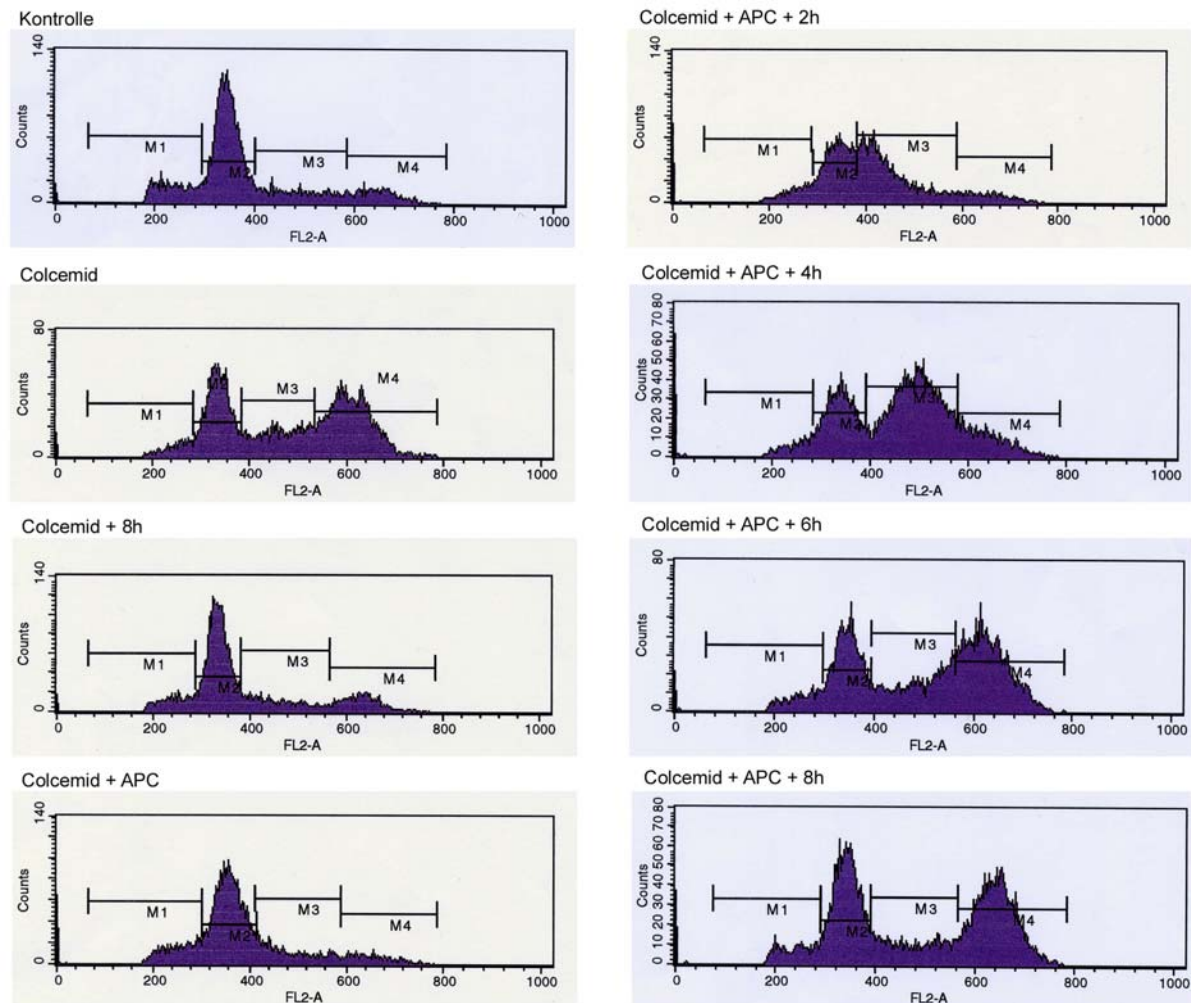


Abb. 3.15: Überprüfung der Zellzyklussynchronisation mittels FACS Analyse.

Abgebildet ist ein aus drei Wiederholungen dieses Versuchs repräsentatives Ergebnis. Herbeigeführt wurde die Synchronisation der HT-1080 Zellen über eine sukzessive Zellzyklusarretierung in den Übergangsphasen G2/M und G1/S mit Colcemid bzw. Aphidicolin, der sich jeweils eine Phase der Zellzyklusprogression anschloss. Der Darstellung kann entnommen werden, dass ca. 50 % der Zellen erfolgreich synchronisiert wurden.

3.4.1. Regulation der MSH Proteine

Während der Untersuchung der Lokalisation der verschiedenen Proteinisofomen von MSH2, MSH3 und MSH6 waren Hinweise darauf gefunden worden, dass selbst die rekombinanten Proteine reguliert werden, da verschiedene Zellen des gleichen Einzelklons unterschiedlich starke Fluoreszenzintensitäten aufwiesen (Abb. 3.13, Aufnahmen D und H). MMR findet hauptsächlich in der S-Phase des Zellzyklus statt und auch das Ausmaß der Akkumulation mit PCNA an UVA induzierten DNA Schäden war in S-Phase Zellen am größten. Daher liegt die Vermutung nahe, dass MSH2, MSH3 und MSH6 einer zellzyklusabhängigen Regulation

unterliegen und in der S-Phase in höheren Konzentrationen vorliegen als in den übrigen Zellzyklusphasen.

Mit einer Kombination aus Zellzyklussynchronisation und Western Blot Analyse sollte diese Hypothese zunächst auf Proteinebene überprüft werden. Für die Western Blots wurden Zellen zu den in Abbildung 3.16 angegebenen Zeitpunkten geerntet.

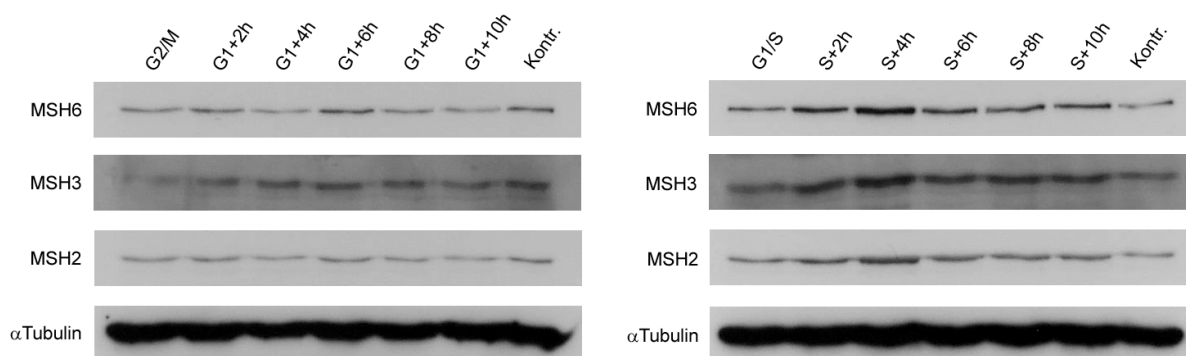


Abb. 3.16: Regulation der endogenen MSH Proteine im Verlauf des Zellzyklus.

Von synchronisierten HT-1080 Zellen wurde zu den angegebenen Zeitpunkten während des Zellzyklus Material geerntet. Aufgetragen wurde jeweils Lysat aus $5 \cdot 10^4$ Zellen. Der Nachweis erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen MSH2, MSH3 und MSH6 sowie zur Überprüfung der aufgetragenen Proteinmengen gegen α Tubulin. Das jeweils stärkste Signal wurde 4 Stunden nach Beginn der S-Phase erhalten (S+4h).

Aus dieser Abbildung ist für alle drei Proteine ein maximal starkes Signal zum Zeitpunkt 4 Stunden nach Start der S-Phase (S+4h) zu erkennen. Die Signale vom Zeitpunkt G1/S und von der Kontrolle sind etwas schwächer als die der übrigen Proben von den S-Phase Zellen, jedoch genauso stark wie oder stärker als die der Proben aus G2/M und G1. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Proteine MSH2, MSH3 und MSH6 während der S-Phase in höherer Konzentration vorliegen als in G2/M oder in G1.

Eine zellzyklusabhängige Regulation der Proteinkonzentrationen von MSH2, MSH3 und MSH6 konnte also gezeigt werden, ebenso eine maximale Konzentration in der S-Phase. Da wie bereits angesprochen selbst die Expression der rekombinanten Proteine reguliert wird, findet diese Regulation wahrscheinlich auf Proteinebene statt. Ob die Expression der Proteine MSH2, MSH3 und MSH6 zusätzlich auf transkriptioneller Ebene reguliert wird, wird mit dem nachfolgend beschriebenen Experiment untersucht.

3.4.2. Regulation auf transkriptioneller Ebene

Mit dem folgenden Experiment sollte überprüft werden, ob die Expression der MSH Gene auch auf transkriptioneller Ebene reguliert wird. Zu diesem Zweck sollten die Wildtyptranskripte und die alternativ gespleißten Transkripte in synchronisierten Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten des Zellzyklus quantifiziert werden. Dabei lag der Fokus auf den MSH2 Transkripten, da MSH2 als Komponente von MutS α und MutS β den stärksten Einfluss auf die Funktionalität von MMR hat.

Zur relativen Quantifizierung der Transkripte wurde die Methode der Real-Time-PCR unter Verwendung von spezifischen Sonden angewendet. Als Template wurden cDNAs von HT-1080 Zellen eingesetzt, die nach Synchronisation zu bestimmten Zeiten des Zellzyklus geerntet wurden. Als Kontrolle wurden nicht synchronisierte HT-1080 Zellen verwendet. Über spezifische Primer und Sonden, die die Sequenzen von Exon 5 nach Exon 6 für MSH2-WT bzw. von Exon 4 nach Exon 6 für MSH2-V1 überspannen, konnten die beiden Transkripte unabhängig voneinander detektiert werden. Dies wurde vorab zur Optimierung des Experiments mit den linearisierten Plasmiden pMC-G-MSH2-WT-P und pMC-G-MSH2-V1-P als Template überprüft und bestätigt. Um die Vergleichbarkeit der von den verschiedenen Proben gewonnenen Messwerte über das standardisierte Verfahren zur cDNA-Synthese (vgl. 2.4.4.) hinaus sicherzustellen, wurde die dem Transkript des *TATA-box binding proteins* (TBP) entsprechende cDNA als endogene Kontrolle amplifiziert und gemessen. So konnten die Δ Ct-Werte berechnet werden, die in Abbildung 3.17b dargestellt sind. Je niedriger sie sind, desto höher ist der Anteil an spezifischer cDNA an der gesamten als Template eingesetzten cDNA.

Die in Abbildung 3.17 dargestellten Ergebnisse gehen auf drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente zurück. Da die Ct-Werte des TBP Transkripts unabhängig von der Zellzyklusphase konstant sind, bestätigt sich die konstitutive Expression des entsprechenden Gens (Abb. 3.17a). Auch die für das MSH2-V1 Transkript ermittelten Δ Ct-Werte sind zu allen untersuchten Zeitpunkten des Zellzyklus etwa gleich hoch, woraus sich schließen lässt, dass dieses Transkript im Verlauf des Zellzyklus in unveränderlichen Mengen vorliegt. Im Gegensatz dazu sind die Δ Ct-Werte des MSH2-WT Transkripts nur für die G2/M-, die G1- und die frühe S-Phase konstant, während der für den Zeitpunkt S+4h ermittelte Wert um mehr als die Hälfte erniedrigt ist. Für die Zeitpunkte S+6h und S+8h steigen die Δ Ct-Werte

langsam wieder an. Die Menge an MSH2-WT Transkript nimmt während der S-Phase also deutlich zu, erreicht ihr Maximum zum Zeitpunkt S+4h und nimmt dann allmählich wieder ab (Abb. 3.17b).

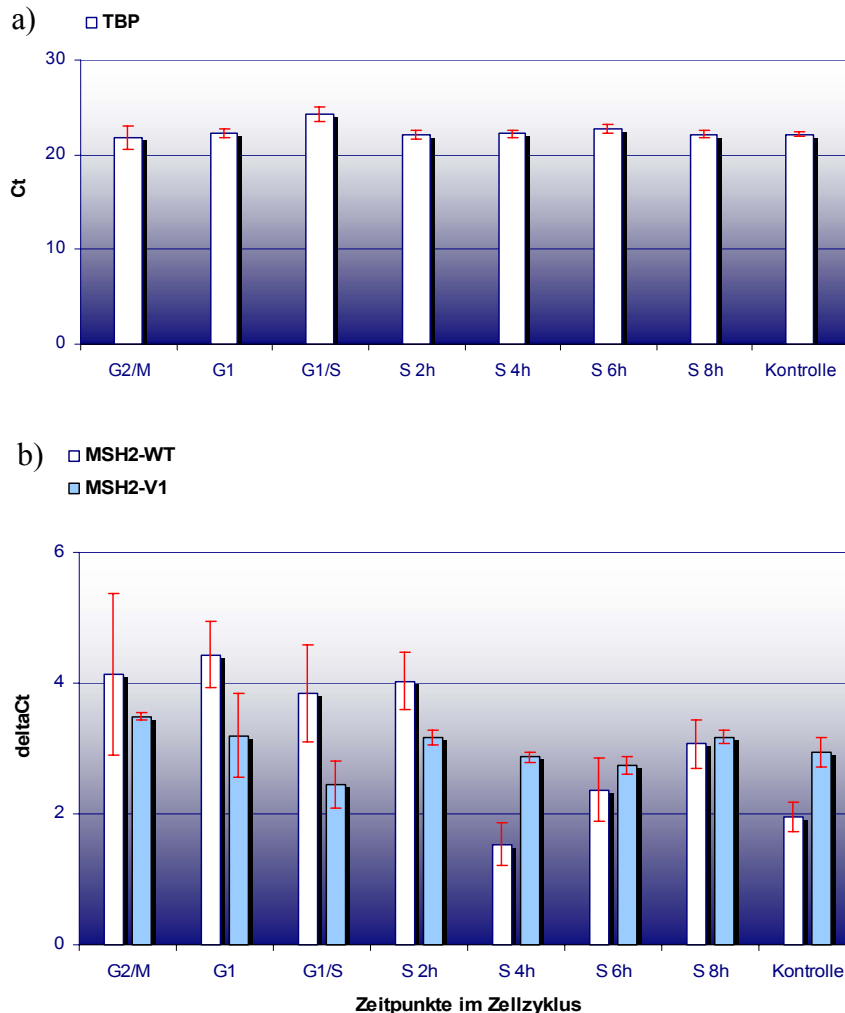


Abb. 3.17: Regulation der Transkripte MSH2-WT und MSH2-V1 im Verlauf des Zellzyklus.

Untersucht wurden cDNAs von synchronisierten HT-1080 Zellen, die zu den in den Grafiken angegebenen Zeitpunkten des Zellzyklus geerntet wurden. Als Kontrolle fungierte eine nicht synchronisierte Population von HT-1080 Zellen. Zur Quantifizierung der Transkripte wurde die Real-Time-PCR Technik angewendet. Die Untersuchung wurde mittels spezifischer Primer und Sonden durchgeführt, über die die Detektion der beiden Transkripte unabhängig voneinander erfolgen konnte.

a) TBP wird im Verlauf des Zellzyklus relativ konstant exprimiert. Dargestellt sind die Ct-Werte aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten unter Angabe der Standardabweichungen in Form von Fehlerbalken. Je niedriger der Ct-Wert, desto höher ist die Menge an spezifischem Transkript.

b) Relative Mengen an MSH2-WT und MSH2-V1 Transkript zu verschiedenen Zeitpunkten des Zellzyklus. Dargestellt sind die Δ Ct-Werte aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten unter Angabe der Standardabweichungen in Form von Fehlerbalken. Die Menge des MSH2-WT Transkripts verändert sich deutlich im Verlauf des Zellzyklus, wohingegen die Menge des MSH2-V1 Transkripts recht konstant ist. Je niedriger der Δ Ct-Wert, desto höher ist die Menge an spezifischem Transkript.

Auf die normalerweise übliche Darstellung der relativen Transkriptmengen wurde verzichtet, da sie die Verrechnung der ΔCt -Werte von den behandelten mit den ΔCt -Werten von den unbehandelten Zellen voraussetzt und der für die unbehandelten Zellen erhaltene Wert in Bezug auf das MSH2-WT Transkript ungewöhnlich hoch ist. Er kann kaum einen Durchschnitt für die übrigen ΔCt -Werte darstellen (Abb. 3.17b). Wahrscheinlich üben die für die Zellsynchronisation verwendeten Substanzen Colcemid und/ oder Aphidicolin einen hemmenden Einfluss auf die Transkription von MSH2 aus. So lässt sich die geringere Menge an MSH2-WT Transkript in synchronisierten gegenüber unbehandelten Zellen erklären. Unter der Annahme, dass Colcemid und/ oder Aphidicolin gleichzeitig das alternative Spleißen zu Gunsten von MSH2-V1 beeinflussen (vgl. 4.10.), stehen die vergleichbaren Mengen dieses Transkripts in synchronisierten und unbehandelten Zellen durchaus im Einklang mit der Hypothese einer gehemmten MSH2 Transkription. Für die Ct-Werte des TBP Transkripts sind keine Unterschiede zwischen den synchronisierten und den unbehandelten Zellen zu erkennen.

Beim direkten Vergleich der Transkriptmengen von MSH-WT und MSH2-V1 in den Kontrollzellen erscheint das Wildtyp Transkript dominant über die Variante. Dies muss aber nicht zwingend die Tatsachen widerspiegeln, da sich die PCR Effizienzen in Abhängigkeit von den ungleichen Primerpaaren unterscheiden können.

Alles in allem konnte gezeigt werden, dass die Menge des MSH2-WT Transkripts in Abhängigkeit vom Zellzyklus reguliert wird und sein Maximum in der S-Phase erreicht, während die Menge des MSH2-V1 Transkripts konstant gehalten wird.

3.4.3. Übersicht über die Regulation von MSH2, MSH3 und MSH6

Auf Proteinebene konnte eine zellzyklusabhängige Regulation für MSH2, MSH3 und MSH6 nachgewiesen werden, wobei stets in der S-Phase die höchste Konzentration vorlag (Abb. 3.16). Eine entsprechende Regulation konnte für MSH2-WT auch auf transkriptioneller Ebene nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu ist die Menge der Transkriptvariante MSH2-V1 während des gesamten Zellzyklus gleich bleibend (Abb. 3.17).

4. Diskussion

Ein Einfluss der MMR auf DNA Reparatur, Zellzykluskontrolle, Apoptose und weitere Prozesse ist mehrfach beschrieben worden, viele Einzelheiten aber sind unbekannt. Daher war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, ein Modellsystem zur *in vivo* Untersuchung von MMR zu etablieren und damit eine Grundlage zur Erweiterung des aktuellen Kenntnisstands zur MMR zu leisten.

4.1. MSI in humanen Tumorzelllinien

4.1.1. Ursachen für MSI in humanen Tumorzelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurden 41 humane MSI Zelllinien aus Tumoren unterschiedlicher Gewebe untersucht, um die Ursachen für MSI zu ermitteln (Tab. 3.2). Dabei wurden in etwa einem Viertel der untersuchten Zelllinien Größenabweichungen der MSH2, MSH3 und/ oder MSH6 Transkripte von mehr als 50 bp von den zu erwartenden Größen festgestellt. Die auf Transkriptebene sichtbaren Veränderungen können sich auf Deletions- oder Insertionsmutationen zurückführen lassen, die sich direkt in der Größenabweichung der detektierten Transkripte widerspiegeln. Darüber hinaus können sie auf Mutationen beruhen, die zu aberranten Spleißprozessen führen. Schließlich können auch diejenigen Regionen von Mutationen betroffen sein, an denen die Primer binden, so dass ein einzelnes Transkriptfragment nicht nachgewiesen werden konnte. Die Abweichungen auf Transkriptebene korrelierten stets mit Abweichungen auf Proteinebene, meist mit dem Fehlen des entsprechenden Proteins. Umgekehrt konnte vielfach kein Protein nachgewiesen werden, obwohl das Transkript scheinbar unverändert vorlag.

Die Abwesenheit der Proteine kann verschiedene Ursachen haben. So kann die Translation aufgrund eines mutierten Translationsstarts vollständig unterbunden sein. Punktmutationen und Insertions- oder Deletionsmutationen können direkt bzw. über Veränderungen des Leserasters zu einer verfrühten Termination der Translation führen. Auch Mutationen, die zu aberrantem Spleißen führen, können über ein Verschieben des Leserasters einen verfrühten Translationsstopp verursachen. Je näher die Verschiebung des Leserasters dem Startcodon ist,

desto geringer ist die Wahrscheinlichkeit, dass das entstehende Protein mit den verwendeten Antikörpern detektiert werden kann. Darüber hinaus wird ein aufgrund einer Mutation nicht funktionales Protein möglicherweise besonders schnell abgebaut und seine Nachweisgrenze damit unterschritten (Übersicht in Goldberg 2003). Die Abwesenheit von Protein muss nicht zwingend auf einer Mutation des entsprechenden Gens basieren. So kann die Proteinstabilität auch von der Präsenz eines Bindungspartners abhängen, wie unter 4.2. diskutiert wird.

Um sämtliche zugrundeliegenden Mutationen erfassen und charakterisieren zu können, müssen die genomischen DNAs sequenziert werden. Dabei können auch Hinweise darauf erhalten werden, ob Mutationen möglicherweise die Funktionalität von nachweisbaren Proteinen negativ beeinflussen. Anhand funktionaler Studien, wie sie von Brieger et al. (2002) mittels transienter Expression von mutierten MSH2 und MLH1 Proteinen in MMR defizienten Zelllinien durchgeführt wurden, können die Auswirkungen spezieller Mutationen direkt untersucht werden. Sind in einer Zelllinie alle untersuchten MMR Proteine vorhanden und nachweislich funktional, dann ist die Ursache für MSI in dieser Linie in Defekten der Effektoren der MMR zu suchen.

Mit Sicherheit lässt sich anhand der hier gewonnenen Daten ein Abschalten der Expression der MSH Gene in den Zelllinien als Ursache für die Entstehung von MSI ausschließen, da die Transkripte der MSH Gene in keinem Fall vollständig fehlten. Ebenso steht fest, dass eine Promotormethylierung von MLH1, die eine der häufigsten Ursachen für MSI in sporadischen Darmtumoren ist (Peltomäki & Vasen 2004), in den untersuchten Zelllinien nur eine untergeordnete Rolle spielt. In den vier untersuchten Darmzelllinien konnte sie nicht nachgewiesen werden. Vermutlich wurden diese Linien aus Tumoren etabliert, die von Patienten mit einer erbten Prädisposition für die Tumorentstehung stammen. Dafür spricht die Tatsache, dass in drei dieser Linien nicht alle der untersuchten MSH Proteine nachgewiesen werden konnten. Da die Promotormethylierung von MLH1 in einer Linie myeloischen Ursprungs nachgewiesen werden konnte, ist davon auszugehen, dass sie prinzipiell auch in anderen Geweben als dem Darm zur Ausprägung von MSI beitragen kann.

4.1.2. MSH3 Polymorphismus

Während der Untersuchung der Transkripte für MSH3 in MSI Zelllinien, wurden für das 5'-Ende Längenvariationen in Abhängigkeit von der untersuchten Zelllinie nachgewiesen. Dabei

traten Unterschiede um 9 bp bzw. ein Vielfaches davon auf (Abb. 3.4). Bereits 1996 veröffentlichten Acharya et al. eine Arbeit, in der sie Längenvariationen um 27 bp in cDNAs von humanem MSH3 beschrieben, die sie auf eine veränderliche Anzahl von 9 bp umfassenden repetitiven Sequenzen zurückführten. Die hier vorgestellten Untersuchungen ergaben, dass diese Variationen in der genomischen DNA festgelegt sind und dass es sich um einen Polymorphismus handelt, bei dem die Konsensus-Sequenz SCYSCAGCK unterschiedlich häufig wiederholt vorliegt. Bei einem Vergleich mit 15 MSS Zelllinien konnte keine Korrelation zwischen bestimmten MSH3 Allelen und der Ausprägung von MSI nachgewiesen werden. Dies steht im Einklang mit der Arbeit von Kawakami et al. (2004), bei der die vergleichende Untersuchung von 102 japanischen Patienten mit Blasenkrebs und 102 gesunden Spendern ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen spezifischen MSH3 Allelen und Tumorerkrankungen erkennen ließ.

4.2. Stabilisierung der Bindungspartner MSH3 und MSH6 durch MSH2

Auffallend an den in Tabelle 3.2 aufgeführten Daten zu den Ursachen von MSI in Zelllinien ist, dass in keiner der 13 Linien, in denen MSH2 Protein fehlt, MSH3 oder MSH6 Protein nachgewiesen werden kann. Dies ist ein Hinweis darauf, dass eine Abhängigkeit der Proteine MSH3 und MSH6 von MSH2 besteht. Tatsächlich kann MSH6 Protein nur dann nachgewiesen werden, wenn gleichzeitig MSH2 Protein vorliegt, wie von Brieger et al. (2002) gezeigt wurde. Diese Gruppe stellte fest, dass die transiente Expression von MSH2 in der ansonsten MSH2 defizienten Zelllinie LOVO 12-96 Stunden nach Transfektion zu nachweisbaren Mengen von MSH2 und MSH6 Protein führte. In nicht transfizierten LOVO Zellen konnte MSH6 Protein nicht detektiert werden. Zwar konnte auch ein MSH2 abhängiger Anstieg der MSH6 Transkription detektiert werden, dieser setzte jedoch erst 24 Stunden nach Erreichen einer nachweisbaren Menge an MSH6 Protein ein. Zusammen mit der Beobachtung, dass das rekombinante MSH2 und das endogene MSH6 Protein exakt zur gleichen Zeit nachgewiesen werden konnten, spricht dies für eine Abhängigkeit der MSH6 Proteinstabilität von der Anwesenheit des Bindungspartners MSH2.

Auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression von rekombinantem MSH2 Protein zu einem deutlichen Anstieg in der Konzentration von endogenem MSH6 Protein führt (Abb. 3.11). Gleichzeitig konnte eine deutliche Zunahme von

endogenem MSH3 Protein detektiert werden. Auf Grundlage der von Brieger et al. (2002) erhobenen Daten kann der Anstieg von endogenem MSH6 Protein auf eine Stabilisierung durch den Bindungspartner MSH2 zurückgeführt und eine entsprechende Stabilisierung von MSH3 durch MSH2 angenommen werden.

Neben der negativen Beeinflussung der Proteinstabilität, kann der Ausfall von funktionalem MSH2 Protein über den dadurch bedingten MMR Defekt außerdem Mutationen der Gene MSH3 und MSH6 begünstigen. Untersuchungen ergaben, dass MSH3 eine Mononukleotid-Wiederholung von 8 Adeninen enthält, die in 16 von 41 (39%) untersuchten Tumoren mit MSI Mutationen aufwies, während eine repetitive Sequenz von 8 Cytosinen im MSH6 Gen in 12 von 40 (30 %) untersuchten Tumoren mutiert war. Bei weiteren Genen, die Mononukleotid-Wiederholungen enthalten und in MMR defizienten Zellen häufig mutiert vorgefunden werden, handelt es sich ebenfalls oft um Tumorsuppressoren, wie TGF β RII, IGFIIR, PTEN etc. (Übersicht in Peltomäki 2001). Auch ein mutationsbedingter Defekt von MSH3 oder MSH6 kann bei funktionalem MSH2 und trotz der teilweisen Redundanz von MutS α und MutS β zu einer Abnahme der MMR Aktivität und einer erhöhten Mutationsrate vor allem in den genannten Genen mit Mononukleotid-Wiederholungen führen. Möglicherweise liegt hier eine Art Sicherheitsmechanismus vor, der die Induktion von Apoptose beschleunigt. Sobald an irgendeiner Stelle des MMR Systems ein Defekt auftritt, wird der vollständige Ausfall der MMR begünstigt und führt in kurzer Zeit zu weiteren gravierenden genetischen Veränderungen. Deren relativ plötzliches und gehäuftes Auftreten könnte erkannt werden und zum Schutz des Organismus vor entarteten Zellen über spezielle Signalwege in der Induktion von Apoptose resultieren. Zellen, bei denen dieser Sicherheitsmechanismus versagt und die deshalb überleben, haben den sogenannten *mutator phenotype*, der sich unter anderem durch MSI auszeichnet.

4.3. Alternative Transkripte für MSH2, MSH3 und MSH6

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die fünf Transkriptvarianten MSH2-V1, MSH3-V3, MSH3-V4, MSH3-V5 und MSH6-V3 nachgewiesen (Abb. 3.6). Dabei handelt es sich um bisher nicht beschriebene Varianten mit Ausnahme von MSH2-V1. Diese Variante zeichnet sich durch ein Fehlen von Exon 5 aus und fand in der Literatur bereits mehrfach Erwähnung (Genuardi et al. 1998; Clarke et al. 2000; Venables & Burn 2006).

Beim Nachweis alternativ gespleißter Transkripte können Artefakte auftreten, die auf einen Template-Wechsel der Reversen Transkriptase zurückzuführen sind. Ein solcher Template-Wechsel erfordert repetitive Sequenzen zu beiden Seiten des vermeintlich herausgespleißten Bereichs (Coquet et al. 2006). Da die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Transkriptvarianten keine entsprechenden Sequenzen aufweisen, ist davon auszugehen, dass es sich bei ihnen um echte Transkriptvarianten handelt. Darüber hinaus ist bei der Suche nach Transkriptvarianten die Unterscheidung zwischen Produkten alternativen und aberranten Spleißens wichtig, da nur erstere eine Bedeutung für physiologische Prozesse in der Zelle haben. Die Sequenzierung der genomischen DNA kann Aufschluss darüber geben, ob in den für den Spleißprozess bedeutenden Sequenzen in der Nachbarschaft der verwendeten Spleißstellen Mutationen vorliegen, die ein aberrantes Spleißen auslösen können. Dabei genügt es nach Arbeiten von Wieringa et al. (1984) jeweils etwa 30 Nukleotide des 5' und des 3' Endes des herausgespleißten Introns zu untersuchen, da diese für einen korrekten Spleißvorgang maßgeblich sind. Schwieriger ist der Nachweis, dass Exon-Spleißverstärker/-repressoren und Intron-Spleißverstärker/-repressoren nicht durch Mutationen verändert sind (Übersicht in Blencowe 2006). Das Gleiche gilt für die Promotorstruktur, die ebenfalls einen Einfluss auf die Nutzung spezifischer Spleißstellen ausübt (Cramer et al. 1997; Pagani et al. 2003). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit sichergestellt, dass es sich bei den Varianten MSH2-V1, MSH3-V3, MSH3-V4, MSH3-V5 und MSH6-V3 um Produkte alternativen Spleißens handelt, indem sie in jeweils mindestens zwei unterschiedlichen Ausgangsmaterialien und alle in der gleichen Probe peripheren Bluts eines gesunden Spenders nachgewiesen wurden. Außerdem sind die Transkriptvarianten auf typische Muster alternativen Spleißens zurückzuführen, nämlich dem Herausspleißen ganzer Exons im Fall von MSH2-V1 und MSH3-V3 bzw. der Nutzung einer alternativen 5' Spleißstelle im Fall von MSH3-V4, MSH3-V5 und MSH6-V3 (Übersicht in Blencowe 2006). Mit Ausnahme der Variante MSH3-V5 gehen alle Transkriptvarianten auf die Nutzung der prominenten Spleißstellen GU und AG zurück. Bei MSH3-V5 wurde als 5' Spleißstelle die seltene, aber dennoch als Spleißstelle beschriebene Dinukleotidsequenz GC genutzt (Burset et al. 2000). Folglich sind die Transkriptvarianten MSH2-V1, MSH3-V3, MSH3-V4, MSH3-V5 und MSH6-V3 aller Wahrscheinlichkeit nach auf alternative Spleißprozesse zurückzuführen.

Zusätzlich zur Variante MSH2-V1 ohne Exon 5 wurden in der Vergangenheit weitere Transkriptvarianten von MSH2 publiziert, die in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden konnten. Mori et al. (1997) führten RT-PCRs mit anschließender Hybridisierung durch und detektierten zwei MSH2 Transkriptvarianten, denen das Exon 13 bzw. die Nukleotide 1898-2156 fehlten. Da mit TA-TT bei der zuletzt genannten Variante gänzlich atypische Spleißstellen vorlagen, kann man annehmen, dass es sich hierbei um ein Produkt aberranten Spleißens handelt. Die Variante ohne Exon 13 wurde von Genuardi et al. (1998) bestätigt. Diese Gruppe analysierte RT-PCR Produkte im Ethidiumbromid gefärbten Agarose-Gel sowie über anschließende Sequenzierung und beschrieb drei weitere MSH2 Transkriptvarianten, nämlich die Variante ohne Exon 5 und zwei Varianten, bei denen die Exons 2-7 bzw. die Exons 2-8 fehlten. Mittels *nested* RT-PCR gefolgt von direkter Sequenzierung des Produkts wiesen Clarke et al. (2000) die zuvor beschriebenen MSH2 Transkripte ohne Exon 5 bzw. ohne Exon 13 nach sowie sieben weitere Transkriptvarianten für MSH2, bei denen die Exons 2-6 vollständig oder Teile der von den Exons 1-5, 1-12, 2-5, 2-6, 3-13 oder 4-13 gebildeten Transkriptbereiche fehlten. Bei keinem der sechs zuletzt genannten Transkripte finden sich Spleißstellen, die den bekannten Paaren GU-AG, GC-AG oder AU-AC entsprechen (Burset et al. 2000) und bei vier dieser Transkripte waren die herausgespleißten Bereiche von repetitiven Sequenzen flankiert. Dies sind deutliche Hinweise darauf, dass es sich bei diesen Varianten nicht um Produkte alternativen Spleißens handelt, sondern um aberrant gespleißte Transkripte bzw. um technische Artefakte. Eine neue Methode zur Anreicherung alternativ gespleißter Transkripte (*enrichment of alternatively spliced isoforms* - EASI) wurde 2006 von Venables & Burn vorgestellt. Diese Methode beruht auf der Hybridisierung von cDNAs, die auf alternativ gespleißte Transkripte zurückgehen, mit solchen, die den Wildtyptranskripten entsprechen. Diejenigen cDNA Abschnitte, die mangels komplementärer Sequenz als Einzelstrang vorliegen, werden von dem Einzelstrang bindenden Protein SSB (*single strand binding protein*) gebunden. Über die Kopplung dieses Proteins an Eisen können die entsprechenden cDNAs magnetisch isoliert werden. Von den verschiedenen in der Literatur für MSH2 beschriebenen Transkriptvarianten wurde mit dieser Methode nur eine bestätigt, nämlich diejenige ohne Exon 5. Auf der anderen Seite wurden drei zusätzliche MSH2 Transkriptvarianten nachgewiesen, denen das Exon 3 oder das Exon 10 fehlen bzw. die ein zusätzliches Exon 9a besitzen. Die EASI Technik ist die einzige der beschriebenen

Methoden, mit der Transkriptvarianten gezielt angereichert werden können. Daher zeichnet sie sich durch eine hohe Sensitivität aus und scheint für den Nachweis alternativ gespleißter Transkripte besonders gut geeignet zu sein. Allerdings birgt die hohe Sensitivität auch die Gefahr der Anreicherung von sehr seltenen und aberranten Spleißprodukten.

Für MSH3 wurde zuvor keine und für MSH6 wurde nur eine Transkriptvariante beschrieben, bei der ab Nukleotid 3173 die gesamte 3' Sequenz fehlt. Diese Variante war bei der Untersuchung einer cDNA Bank von Shiwaku et al. (1997) gefunden worden.

Selbst wenn man die artifiziellen und die auf aberrante Spleißprodukte zurückzuführenden Transkriptvarianten unberücksichtigt lässt, fallen die Ergebnisse der einzelnen Arbeitsgruppen sehr verschieden aus. Ein Grund für die Differenzen ist in der Nutzung verschiedener Methoden zum Nachweis der Transkriptvarianten begründet. Allein durch die Wahl der Primer, der PCR Bedingungen und der verwendeten PCR Reagenzien bei Anwendung der allen Untersuchungen zugrundeliegenden RT-PCR Technik können die Ergebnisse voneinander abweichen. Außerdem wurde bei allen Untersuchungen einschließlich der in der vorliegenden Arbeit vorgestellten mit unterschiedlichen Ausgangsmaterialien gearbeitet. Daher muss angenommen werden, dass die Variationen zumindest zum Teil auf nur gewebespezifisch in Erscheinung tretenden Transkriptvarianten basieren. Die Beschränkung einiger Transkriptvarianten auf spezifische Gewebe konnte in Mäusen nachgewiesen werden (Sugnet et al. 2006). Damit lässt sich auch erklären, warum mit der sensitiven EASI Technik nur eine der bisher beschriebenen Transkriptvarianten für MSH2 nachgewiesen werden konnte. Für die Untersuchung wurde ausschließlich RNA aus Hodengewebe verwendet.

An übereinstimmenden Ergebnissen sind die mehrfach unabhängig voneinander erfolgten Nachweise der Spleißvarianten ohne Exon 5 bzw. ohne Exon 13 für MSH2 zu nennen. Erstere Variante wurde auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit gefunden und als MSH2-V1 bezeichnet.

4.4. Proteinisoformen für MSH2, MSH3 und MSH6

Der Nachweis von Proteinisoformen, die den Transkriptvarianten MSH2-V1 und MSH6-V3 entsprechen, erfolgte mittels 2D-Gelelektrophorese. Dabei wurden mit spezifischen Antikörpern jeweils zwei Signale für MSH2 und MSH6 erhalten (Abb. 3.8).

Anhand der Sequenzen waren für die Proteine MSH2-WT und MSH2-V1 die Isoelektrischen Punkte (IEPs) 5,6 bzw. 5,9 berechnet worden. Signale wurden mit dem MSH2 spezifischen Antikörper bei 5,7 und 5,8 detektiert. Aufgrund der weitgehenden Übereinstimmung der berechneten IEP-Werte mit den IEP-Werten, die für die experimentell nachgewiesenen Proteine ermittelt wurden, lässt sich annehmen, dass die beiden detektierten Signale auf die Proteinisoformen MSH2-WT und MSH2-V1 zurückzuführen sind. Die geringfügigen Differenzen zwischen den berechneten und den experimentell ermittelten IEP-Werten lassen sich mit einer gewissen Ungenauigkeit der für die Isoelektrische Fokussierung (IEF) im immobilisierten pH-Gradienten (IPG) verwendeten IPG-Streifen erklären (persönliche Mitteilung von J. Wissing). Dass eine Phosphorylierung als posttranslationale Modifikation von MSH2-WT anstelle der Proteinisoform MSH2-V1 zu dem zweiten Spot führt, kann weitgehend ausgeschlossen werden. Christmann et al. (2002) haben mittels Radioimmunpräzipitation untersucht, ob MSH2 und MSH6 phosphoryliert werden, konnten jedoch keine Phosphorylierung für MSH2 zeigen. Einschließlich der vorliegenden Arbeit wurde das alternativ gespleißte Transkript MSH2-V1 ohne Exon 5 viermal unabhängig voneinander beschrieben (Genuardi et al. 1998; Clarke et al. 2000; Venables & Burn 2006). Darüber hinaus finden sich in der Literatur diverse Hinweise auf die Existenz eines im Cytoplasma lokalisierten MSH2 Proteins (Christmann & Kaina 2000; Marquez et al. 2004; Schroering et al. 2007), wobei es sich wie unter 4.7. diskutiert um MSH2-V1 handeln kann. Folglich ist davon auszugehen, dass die für MSH2 detektierten Proteinisoformen dem Wildtypprotein MSH2-WT und der Proteinvariante MSH2-V1 entsprechen.

Auch bei den beiden Signalen, die mit dem MSH6 spezifischen Antikörper experimentell bei 6,75 bzw. 6,85 detektiert wurden, kann es sich um die Proteinisoformen MSH6-WT und MSH6-V3 handeln, für die IEPs von 6,5 bzw. 6,1 berechnet wurden. Phosphorylierungen verursachen eine Verschiebung in Richtung eines niedrigeren IEP-Wertes, wie bioinformatisch überprüft wurde (http://scansite.mit.edu/calc_mw_pi.html). Daher lässt sich die Differenz zwischen theoretisch berechneten und experimentell ermittelten IEP-Werten nicht mit Phosphorylierungen erklären. Auch hier kann die Ungenauigkeit der IPG-Streifen angeführt werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass MSH6 phosphoryliert wird (Christmann et al. 2002). Deswegen ist nicht auszuschließen, dass die detektierten Signale beide auf das Wildtypprotein zurückzuführen sind, das einmal phosphoryliert und einmal nicht

phosphoryliert vorliegt. In Analogie zu MSH2 jedoch ist wahrscheinlich, dass es sich auch hier um das Wildtypprotein und die der Transkriptvariante MSH6-V3 entsprechende Proteinisoform handelt.

Mit MSH3 spezifischen Antikörpern konnten im Western Blot in diversen untersuchten Zelllinien wie in Abbildung 3.7 dargestellt zwei Banden detektiert werden. Da die rekombinant exprimierten MSH3-WT und MSH3-V3 Fusionsproteine ein vergleichbares Laufverhalten relativ zueinander aufweisen wie diese beiden Banden, kann man annehmen, dass es sich dabei um endogenes MSH3-WT und MSH3-V3 Protein handelt. Der Nachweis der 45 bzw. 41 Aminosäuren langen Peptide MSH3-V4 und MSH3-V5 war nicht möglich, da kein geeigneter Antikörper zur Verfügung stand.

Prinzipiell lässt der Nachweis der alternativ gespleißten Transkripte den Schluss zu, dass die Proteinvarianten auch endogen translatiert werden. Es liegen diverse Hinweise für die Existenz verschiedener Proteinisoformen für MSH2, MSH3 und MSH6 vor. Dazu zählen insbesondere der Nachweis von jeweils zwei Spots in der 2D-Gelelektrophorese sowie die Detektion von Doppelbanden im Western Blot unter Verwendung spezifischer Antikörper. Für eine endgültige Bestätigung, dass es sich dabei um die den Transkriptvarianten MSH2-V1, MSH3-V3 und MSH6-V3 entsprechenden Proteinisoformen handelt, können die detektierten Proteine mittels Massenspektroskopie analysiert werden. Alternativ können spezifische Antikörper zum Nachweis der Proteinisoformen generiert werden.

4.5. MSH Proteine exprimierende Einzelklone als Werkzeuge für MMR Studien

Seit ihrer Entdeckung in Prokaryoten in den 1980er Jahren bzw. in Eukaryoten in den 1990er Jahren ist MMR Gegenstand intensiver Forschung (Übersicht in Marra & Boland 1995). Trotzdem wurden in der Literatur keine Hinweise auf die Existenz einer stabil mit MSH2/MSH6 oder MSH2/MSH3 transfizierten humanen Zelllinie erhalten. Lediglich zwei Publikationen über die stabile Expression von rekombinantem MSH6 wurden nach intensiver Recherche gefunden (Lettieri et al. 1999; Kleczkowska et al. 2000). Dies spiegelt die Schwierigkeiten wider, die bei der mit einer Transfektion verbundenen Überexpression von MSH Proteinen auftreten. Auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Beobachtungen angestellt, die auf einen starken Eingriff der MSH Proteine in die Zellphysiologie hinweisen, wie die Herunterregulierung der endogenen MSH Proteine in den die rekombinanten

Wildtypproteine exprimierenden Zellen. Aber auch die relativ geringen Klonzahlen nach Transfektion und die schwache Expression der Fusionsproteine trotz Verwendung eines CMV Promotors zählen dazu. Sie wurden gleichermaßen für die rekombinanten Wildtypproteine als auch für die Proteinvarianten beobachtet und können als Indiz für die Funktionalität aller rekombinant exprimierten MSH Proteine gedeutet werden. Eine Ursache für die Schwierigkeiten der Überexpression liegt sicherlich in der Beteiligung von MMR an der Induktion von Zellzyklusarrest und Apoptose begründet. Dafür spricht der Misserfolg bei der Rekonstitution der MMR defizienten Zelllinien LOVO, HCT-116 und DLD-1. Die transfizierten Zellen zeigten einen Proliferationsarrest und Veränderungen der Zellmorphologie auf. Vier bis fünf Tage nach der Transfektion hatte sich die Mehrheit der Zellen abgekugelt und typische Strukturen eines G2/M Arrests ausgebildet („Seeigel-Morphologie“, persönliche Mitteilung von W.G. Dirks). Darüber hinaus konnten Zhang et al. (1999) zeigen, dass 96 Stunden nach transients Überexpression von MSH2 etwa 20 % der transfizierten Zellen in Apoptose gegangen waren. Für mit MSH3 oder MSH6 transfizierte Zellen wurde in dem beobachteten Zeitraum von 96 Stunden keine Apoptose nachgewiesen (Zhang et al. 1999). In der hier vorgestellten Arbeit wurden nach Transfektionen sehr geringe Klonzahlen beobachtet. Dies spricht für ein durch alle überexprimierten MSH Proteine verursachtes Absterben der Zellen, wobei unter Berücksichtigung der von Zhang et al. (1999) erhobenen Daten angenommen werden muss, dass der schädigende Effekt von MSH3 und MSH6 im Gegensatz zu MSH2 verzögert einsetzt. In welchem Ausmaß dabei eine direkte Induktion von Apoptose eine Rolle spielt, kann anhand der vorliegenden Daten nicht ausgesagt werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden aus den zwei humanen Zelllinien 293 und HT-1080 hervorgehend jeweils vier Einzelklone etabliert, die MSH2, MSH3 oder MSH6 Wildtypprotein bzw. eine der Proteinvarianten MSH2-V1, MSH3-V3, MSH3-V4, MSH3-V5 oder MSH6-V3 stabil exprimieren können. Darüber hinaus existieren Einzelklone, die Kombinationen von MSH2-WT oder MSH2-V1 Protein mit den übrigen Proteinen stabil exprimieren können, so dass unter anderem rekombinantes MutS α bzw. MutS β exprimiert werden kann. Ebenso können sämtliche der genannten MSH Proteine stabil in Kombination mit PCNA exprimiert werden. Voraussetzung für den Erfolg der Transfektion war die Nutzung der unter 3.3.2. vorgestellten bi- und tricistronischen Expressionsvektoren (Tab. 3.4). Über die gekoppelte Transkription ist die Translation von gewünschtem Protein bei

Translation des Markerproteins weitgehend sichergestellt. Deshalb ermöglichen diese Vektoren selbst die Expression der offensichtlich stark in die Physiologie der Zellen eingreifenden MSH Proteine. Da jedes einzelne der rekombinant exprimierten Proteine mit einem spezifischen Fluoreszenzprotein fusioniert ist, stellen die Einzelklone wertvolle Werkzeuge für sämtliche Untersuchungen an MMR dar, die mittels *live-cell imaging* durchgeführt werden können. Dazu zählen Studien zur Beteiligung von MMR an der Reparatur von bzw. an der Zellantwort auf DNA Schäden, die zum Beispiel durch unterschiedliche Strahlen oder Chemikalien erzeugt werden. Am Beispiel der in dieser Arbeit durchgeführten und unter 4.8. diskutierten Analyse zur UVA Bestrahlung konnte der Nutzen der so etablierten Modellsysteme erfolgreich demonstriert werden. So konnte mithilfe dieser Modellsysteme erstmals eine Beteiligung von MutS β an der Zellantwort auf UVA induzierte DNA Schäden nachgewiesen und eine Kinetik über die Anreicherung von MSH2, MSH3 und MSH6 an Orten UVA induzierter DNA Schäden erstellt werden. Die Vorteile der Einzelklonselektion liegen in den genetisch einheitlichen Zellpopulationen, die den Vergleich einzelner Zellen miteinander ermöglichen, weil sowohl auf der Zahl der inserierten Kopien als auch auf den Orten der Insertion beruhende Unterschiede ausgeschlossen werden können.

4.6. Bildung der Heterodimere MutS α und MutS β

Über standardisierte Co-Immunpräzipitationen konnte nachgewiesen werden, dass die rekombinant exprimierten MSH2-WT, MSH3-WT und MSH6-WT Fusionsproteine mit ihren jeweiligen endogenen Bindungspartnern heterodimerisieren (Abb. 3.12). Daher kann angenommen werden, dass diese Proteine funktional sind.

Neben MutS α und MutS β ist ein weiteres Heterodimer an der MMR beteiligt, nämlich MutL α . Dieses setzt sich aus den Proteinen MLH1 und PMS2 zusammen, die in gesunden Zellen im Kern vorliegen (Wu et al. 2003). Hingegen ist in der MLH1 defizienten Zelllinie HCT-116 überexprimiertes MLH1 oder PMS2 überwiegend im Cytoplasma lokalisiert (Wu et al. 2003). Beide Proteine besitzen sowohl Zellkern-Lokalisationssignale (*nuclear localization signals* - NLS) als auch Kernexportsignale (*nuclear export signals* - NES). Wu et al. (2003) konnten zeigen, dass der Transport in den Zellkern nur dann erfolgt, wenn MLH1 und PMS2 dimerisieren. Darauf aufbauend stellten sie die Hypothese auf, dass die Dimerisierung als

Voraussetzung für die Lokalisation von MutL α im Zellkern einen Anteil an der Feinabstimmung der MMR Funktionen in der Zelle haben könnte.

Ähnliches kann für MutS α und MutS β angenommen werden. Dafür spricht vor allem die Tatsache, dass die den beiden Heterodimeren gemeinsame Komponente MSH2 im Gegensatz zu ihren Bindungspartnern MSH3 und MSH6 gemäß bioinformatischer Analyse keine NLS Sequenz besitzt (vgl. 1.2.2.). Daher ist es wahrscheinlich, dass MSH2 nur in Abhängigkeit von der Bindung an MSH3 oder MSH6 in den Zellkern gelangt. Desweiteren wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Proteinvariante MSH2-V1 untersucht, die im Gegensatz zum rekombinant exprimierten MSH2-WT Protein weder endogenes MSH3 noch endogenes MSH6 bindet und als einziges der MSH Proteine ausschließlich im Cytoplasma lokalisiert ist. Dabei wurde die Fähigkeit zur Heterodimerisierung über die Methode der Co-Immunpräzipitation überprüft. Man könnte also argumentieren, dass der Nachweis einer Heterodimerisierung erschwert ist, weil die potentiellen Partner in unterschiedlichen Zellkompartimenten vorliegen. Dem ist jedoch entgegenzuhalten, dass die Translation aller Proteine im Cytoplasma stattfindet und die Heterodimerisierung von endogenem MSH2 und MSH6 ebenfalls im Cytoplasma erfolgt (Christmann & Kaina 2000). Der Vergleich von rekombinantem MSH2-WT und MSH2-V1 Protein lässt also den Schluss zu, dass eine Korrelation zwischen der Fähigkeit zur Heterodimerisierung und der nukleären Lokalisation von MSH2 besteht. Daher lässt sich die von Wu et al. (2003) formulierte Hypothese auf MutS α und MutS β übertragen. Dabei wird die über die Lokalisation bestimmende Fähigkeit zur Dimerisierung in Bezug auf diese beiden Heterodimere auf Ebene der Prä-mRNA Prozessierung festgelegt, indem alternatives Spleißen entweder das Transkript für MSH2-WT oder für MSH2-V1 begünstigt.

Die Proteinvariante MSH3-V3 liegt zwar im Nukleus vor, bindet aber kein MSH2 und kann daher nicht das funktionale Heterodimer MutS β bilden. Es ist denkbar, dass die MutS β Aktivität über alternatives Spleißen des MSH3 Transkripts reguliert wird, in Analogie zur gleichzeitigen Regulation von MutS α und MutS β über alternatives Spleißen des MSH2 Transkripts.

Da MSH2-V1 weder MutS α noch MutS β und MSH3-V3 kein MutS β bilden kann, lässt sich schlussfolgern, dass die Aminosäuresequenzen, die von Exon 5 bzw. von den Exons 12 und 13 codiert werden und diesen Proteinen fehlen, direkt oder indirekt die Fähigkeit zur

Heterodimerisierung vermitteln. Die N-terminalen 99 Aminosäuren von MSH6 hingegen haben keinen Einfluss auf die Heterodimerisierung, da ihr Fehlen in der Proteinvariante MSH6-V3 die Bindung an endogenes MSH2 nicht beeinträchtigt.

4.7. Lokalisation der Proteine MSH2, MSH3 und MSH6 sowie ihrer Varianten

Mittels fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen konnte gezeigt werden, dass die mit GFP oder YFP fusionierten Proteine MSH2-WT, MSH3-WT und MSH6-WT ausschließlich im Kern lokalisiert sind (Abb. 3.13, Aufnahmen A, C und G). Die nicht nukleären Verteilungsmuster von YFP-MSH2-V1 oder nur teilweise nukleären Verteilungsmuster von YFP-MSH3-V4, YFP-MSH3-V5 und den reinen Fluoreszenzproteinen (Abb. 3.13, Aufnahmen B, E, F und L) zeigen, dass die nukleäre Lokalisation nicht auf einen Einfluss des Fluoreszenzproteins zurückzuführen ist. Die nukleäre Lokalisation von MSH2 Protein ist nach Untersuchungen an Rattenhirn und humanen Ameloblastomen schon früher von Belloni et al. (1999) bzw. Castrilli et al. (2001) beschrieben worden. Marquez et al. (2004), Christmann & Kaina (2000) sowie Schroering et al. (2007) hingegen haben MSH2 nicht nur im Kern, sondern auch im Cytoplasma nachgewiesen. In unbehandelten, in der Interphase befindlichen *mouse embryonic fibroblasts* (MEFs) konnten Marquez et al. (2004) MSH2 mittels Immunfluoreszenzfärbungen ausschließlich im Nukleus detektieren. Während der Mitose war MSH2 über die gesamte Zelle verteilt, also nicht mit den Chromosomen assoziiert. Dies deckt sich mit im Rahmen der vorliegenden Arbeit gemachten Beobachtungen. Aber auch während der Interphase konnten sie geringe Mengen an MSH2 im Cytoplasma nachweisen, wenn die Zellen zuvor mit geringen Dosen Cisplatin oder Colcemid behandelt wurden. Dies kann bedeuten, dass die Zellen die intranukleäre MSH2 Konzentration verringern, um einer MMR induzierten Apoptose entgegen zu wirken und Zeit für eine Reparatur zu gewinnen. Christmann & Kaina (2000) detektierten MSH2 in nukleären und cytoplasmatischen Fraktionen von HeLa MR Zellen. Nach Behandlung mit dem alkylierenden Agens N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine (MNNG) stellten sie eine Translokation von cytoplasmatischem MSH2 in den Kern fest. Da sie mit letalen Dosen von MNNG gearbeitet haben, war der ausgelöste DNA Schaden möglicherweise so groß, dass er über eine Reparatur nicht mehr behoben werden konnte. Die Erhöhung der MSH2 Konzentration im Kern könnte entsprechend zur Induktion von Apoptose beitragen. Eine

Untersuchung nukleärer und cytoplasmatischer Fraktionen wurde auch von Schroering et al. (2007) durchgeführt, und zwar an HeLa und NIH3T3 Zellen. Dabei wiesen sie MSH2 in allen Zellzyklusphasen im Kern und im Cytoplasma nach. MSH6 wiesen sie ebenfalls im Kern nach, im Cytoplasma allerdings nur in sehr geringen Mengen.

Da in der vorliegenden Arbeit das Protein MSH2-WT nur im Kern nachgewiesen werden konnte und MSH2-V1 nur im Cytoplasma (Abb. 3.13, Aufnahmen A und B), handelt es sich bei dem von Marquez et al. (2004), Christmann & Kaina (2000) sowie Schroering et al. (2007) im Cytoplasma detektierten MSH2 möglicherweise um MSH2-V1. Dafür spricht vor allem die Tatsache, dass Schroering et al. (2007) große Mengen an MSH2 im Cytoplasma nachweisen konnten, aber nur sehr geringe Mengen an dem Bindungspartner MSH6, und dass MSH2-V1 keine Bindung mit MSH6 eingeht (Abb. 3.12a). Die von Marquez et al. (2004) sowie Christmann & Kaina et al. (2000) beobachteten Translokationen von MSH2 könnten dann auf ein verstärktes Spleißen zu Gunsten von MSH2-V1 und zu Ungunsten von MSH2-WT bzw. umgekehrt zurückzuführen sein. Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass die vermeintliche Translokation erst ca. 4 Stunden nach Behandlung der Zellen maximal nachzuweisen war und entspricht der unter 4.6. vorgestellten Hypothese, dass alternatives Spleißen des MSH2 Transkripts mit an der Regulation der MMR Funktionen beteiligt ist. Auch mit der von beiden Gruppen dokumentierten gleich bleibenden Transkription steht diese Hypothese im Einklang. Widersprüchlich ist in diesem Zusammenhang nur die allerdings nicht mit Daten belegte Aussage von Christmann & Kaina (2000), dass sie die gleichen Beobachtungen bei blockierter Proteinsynthese machen konnten.

MSH2-V1 ist das einzige der MSH Proteine, das ausschließlich im Cytoplasma nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.13, Aufnahme B). Es ist also nicht an der nukleären MMR beteiligt. Denkbar ist, dass es an MMR von mitochondrialer DNA beteiligt ist. Vor allem aufgrund der räumlichen Nähe zur Atmungskette, ist mitochondriale DNA in erhöhtem Maß der schädigenden Wirkung von reaktiven Sauerstoffspezies ausgesetzt (Richter et al. 1998). Da in *Saccharomyces cerevisiae* ein Fehlpaarungen bindendes MSH Protein in den Mitochondrien nachgewiesen werden konnte, nämlich MSH1 (Chi & Kolodner 1994), kann prinzipiell angenommen werden, dass MMR auch in humanen Mitochondrien zum Erhalt der dort gespeicherten Erbinformationen beiträgt. Nach dem Anfärben von Mitochondrien konnte eine Co-Lokalisation mit fluoreszenzmarkiertem MSH2-V1 jedoch nicht gezeigt werden

(persönliche Mitteilung von C. Mielke). Auch konnte in aus isolierten Mitochondrien gewonnenem Lysat weder endogenes noch rekombinantes MSH2-V1 Protein nachgewiesen werden (persönliche Mitteilung von W.G. Dirks).

4.8. Co-Lokalisation von MSH Proteinen mit PCNA an UVA geschädigter DNA

4.8.1. MSH Wildtypproteine co-lokalisieren mit PCNA

Durch UVA Bestrahlung werden vor allem Cyclobutan Pyrimidin Dimere (CPDs), [6-4] Photoproducte und 8-Hydroxyguanine verursacht, deren Reparatur über Nukleotid-Excisionsreparatur (NER) und Basen-Excisionsreparatur (BER) erfolgt. Da PCNA sowohl an NER als auch BER beteiligt ist (Übersicht in Moldovan et al. 2007), war dessen Akkumulation an den Orten der UVA induzierten DNA Schäden zu erwarten (Abb. 3.14). Auch die Kinetik, mit der PCNA an diesen Orten akkumuliert, stimmt überein mit der von Lan et al. (2004) veröffentlichten Kinetik zur Anreicherung von PCNA an oxidativen DNA Schäden. In der genannten Arbeit wurden anhand der Kinetiken der Anreicherung von XRCC1 und PCNA an Orten oxidativer DNA Schäden Rückschlüsse auf die Kinetiken von BER und NER gezogen. Demzufolge wird die unter Mitwirkung von XRCC1 vollendete und von PCNA unabhängige *short-patch* BER deutlich schneller abgeschlossen, als *long-patch* BER und NER, an denen PCNA beteiligt ist. Mit der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die rekombinanten Wildtypproteine MSH2, MSH3 und MSH6 am Ort UVA induzierter DNA Schäden mit PCNA co-lokalisieren, und zwar mit etwa der gleichen Geschwindigkeit wie PCNA (Abb. 3.14a, Aufnahmen A, C und G; Abb. 3.14b). Es kann also davon ausgegangen werden, dass MSH2, MSH3 und MSH6 in Form der funktionalen Heterodimere MutS α und MutS β akkumulieren und aufgrund der übereinstimmenden Kinetiken ist denkbar, dass die MMR Proteine mit *long-patch* BER oder NER direkt interagieren, nicht jedoch mit *short-patch* BER.

Wegen ihrer Spezifität für Fehlpaarungen und IDLs ist es jedoch wahrscheinlicher, dass MutS α und MutS β nicht an den UVA induzierten DNA Schäden an sich akkumulieren, sondern an während der Replikation erzeugten Fehlpaarungen. Diese entstehen in erhöhtem Maße, wenn die Replikation an Orten nicht reparierter DNA Schäden von Transläsions-

polymerasen vorangetrieben wird (Zhang et al. 2000; Chiapperino et al. 2005). Für diese Theorie spricht die Tatsache, dass die Anreicherung am deutlichsten während der S-Phase zu beobachten war, in der möglicherweise viele der UVA Schäden von den Replikationsgabeln erreicht werden, ehe sie von NER oder BER eliminiert werden können. Auch die wiederholt beschriebene Steigerung der Affinität von MutS α für UV induzierte DNA Schäden in Kombination mit fehlgepaarten Basen (Wang et al. 1999; Mazurek et al. 2002) steht im Einklang mit dieser Hypothese. Wenn MutS α und MutS β die fehlgepaarten Basen binden, können sie die Reparatur der Fehlpaarung initiieren. Dabei würde die Korrektur einen fehlerfreien Umgehungsmechanismus während der Reparatursynthese erfordern, da die geschädigte Base im parentalen Strang nach wie vor vorhanden wäre. Möglich ist auch, dass eine Korrektur aufgrund der geschädigten Basen eben nicht erfolgen kann und sich stattdessen ein aussichtsloser Zyklus von MMR vermittelter Excision und Reparatursynthese ständig wiederholt und schließlich zum Zellzyklusarrest oder zur Apoptose führt (Übersicht in Iyer et al. 2006).

Das MMR System stellt damit aller Wahrscheinlichkeit nach eine Sicherung zur Vermeidung von Mutationen dar, die aus Fehlern resultieren könnten, die während der Replikation über die Aktivität von Transläsionspolymerasen an Orten UVA induzierter DNA Schäden entstehen. Als eine derartige Sicherung fungiert MMR möglicherweise in Bezug auf weitere DNA Schäden, die während der Replikation die Aktivität von Transläsionspolymerasen auslösen. So ließe sich die mehrfach beschriebene Beteiligung von MMR an der Induktion von Zellzyklusarrest und/ oder Apoptose als Antwort auf DNA Schäden erklären, die durch UVB Bestrahlung oder die Behandlung mit alkylierenden Agenzien hervorgerufen werden (Young et al. 2004; van Oosten et al. 2005; Aquilina et al. 1999; Yoshioka et al. 2006).

4.8.2. MSH Proteinvarianten co-lokalisieren nicht mit PCNA

Für die Proteinvarianten MSH2-V1, MSH3-V3, MSH3-V4, MSH3-V5 und MSH6-V3 ist keine Akkumulation an Orten UVA induzierter DNA Schäden nachweisbar (Abb. 3.14a, Aufnahmen B, D-F und H).

Im Fall von MSH2-V1 ist dies zu erwarten, da diese Proteinvariante nur außerhalb des Zellkerns vorliegt (Abb. 3.13, Aufnahme B). MSH3-V3, MSH3-V4 und MSH3-V5 bilden kein MutS β mit MSH2 (Abb. 3.12b) und können daher keine DNA binden. Damit lässt sich

erklären, warum eine Anreicherung dieser Proteinvarianten an Orten UVA induzierter DNA Schäden nicht nachweisbar ist. MSH6-V3 hingegen ist kernständig (Abb. 3.13, Aufnahme H) und heterodimerisiert mit endogenem MSH2 (Abb. 3.12c). Trotzdem ist nach UVA Bestrahlung keine Akkumulation dieser Proteinvariante an der geschädigten DNA detektierbar. Da sich MSH6-V3 vom MSH6 Wildtypprotein vor allem im Fehlen eines PCNA Bindemotivs (PIP-Box) auszeichnet (vgl. 3.2.3.), legt dies die Vermutung nahe, dass die Akkumulation von MutS α und MutS β an UVA induzierten DNA Schäden in Abhängigkeit von einer Bindung an PCNA erfolgt. Dies steht im Einklang mit dem von Lau & Kolodner (2003) erarbeiteten Modell, nach dem MutS α während der DNA Synthese an PCNA gebunden ist und bei Kontakt mit einer Fehlpaarung dissoziiert. Zwar konnte eine MutS α abhängige Induktion von MMR *in vitro* auch in Abwesenheit von PCNA beobachtet werden, jedoch nur bei Vorhandensein eines Einzelstrangbruchs in 5'-Richtung von der Fehlpaarung (Genschel & Modrich 2003; Dzantiev et al. 2004). Möglicherweise findet eine von PCNA unabhängige Induktion von MMR *in vivo* nur in seltenen Fällen statt. Tatsache ist, dass PCNA eine bedeutende Rolle in den der Synthese vorangehenden Reparaturschritten zugesprochen wird (Umar et al. 1996; Dzantiev et al. 2004) und dass es für die Reparatursynthese während der MMR unentbehrlich ist (Gu et al. 1998).

Zusammenfassend kann geschlossen werden, dass die Akkumulation von MSH Proteinen an Orten UVA induzierter DNA Schäden sowohl von der Fähigkeit zur Heterodimerisierung als auch von der Fähigkeit zur Bindung an PCNA abhängt.

4.8.3. Übersicht über das UVA Experiment

Aus dem Experiment zur Co-Lokalisation von MSH Proteinen mit PCNA an Orten UVA induzierter DNA Schäden wurden zuvor noch nicht veröffentlichte Ergebnisse und Erkenntnisse gewonnen. Erstmals konnte eine Beteiligung von MutS β an der Zellantwort auf UVA Schäden nachgewiesen werden. Darüber hinaus lieferte dieses Experiment die erste Kinetik über die Anreicherung von MSH2, MSH3 und MSH6 an Orten UVA induzierter DNA Schäden. Schließlich wurde ein starker Hinweis auf die Abhängigkeit einer Beteiligung von MMR an der Zellantwort auf UVA Schäden von PCNA erhalten.

4.9. Eigenschaften und Funktionen der alternativen Proteine

Der Nachweis, dass die rekombinant exprimierten mit Fluorochromen gekoppelten Proteine MSH2-WT, MSH3-WT und MSH6-WT mit den endogenen Partnern die Heterodimere MutS α und MutS β bilden können (Abb. 3.12), zeigt deren Funktionalität auf. Ebenso verhält es sich mit der auf den Kern beschränkten intrazellulären Lokalisation dieser Proteine (Abb. 3.13, Aufnahmen A, C und G) sowie deren Co-Lokalisation mit PCNA an UVA induzierten DNA Schäden (Abb. 3.14a, Aufnahmen A, C und G). Einen weiteren Hinweis auf die Funktionalität aller rekombinant exprimierten Proteine liefert die Beobachtung der niedrigen Klonzahlen (vgl. 3.3.3.1.) und der schwachen Expression nach Transfektion (vgl. 3.3.4.2.). Daher kann grundsätzlich davon ausgegangen werden, dass die rekombinant exprimierten Proteinvarianten MSH2-V1, MSH3-V3, MSH3-V4, MSH3-V5 und MSH6-V3 funktional sind, und im Vergleich zu den Wildtypproteinen unterschiedliche Eigenschaften auf den spleißbedingten Variationen basieren. Diese Eigenschaften werden im Folgenden für die einzelnen Proteinvarianten besprochen.

MSH2-V1

Das Fehlen von Exon 5 führt bei der Proteinvariante MSH2-V1 im Vergleich zum MSH2-WT Protein zum Verlust der Fähigkeit zur Heterodimerisierung mit MSH3 und MSH6 (Abb. 3.12a). Daher muss davon ausgegangen werden, dass die von Exon 5 codierte Sequenz die Fähigkeit zur Heterodimerisierung vermittelt. Dabei ist ein indirekter Einfluss dieser Sequenz über die Gewährleistung einer bestimmten Proteinstruktur anzunehmen, da die für die Heterodimerbildung entscheidenden Protein-Protein-Interaktionen über die C-Termini der jeweiligen Bindungspartner erfolgen (Obmolova et al. 2000; Warren et al. 2007). Nach rekombinanter Expression wurde für MSH2-V1 im Gegensatz zu MSH2-WT in allen Zelllinien eine ausschließlich cytoplasmatische Lokalisation beobachtet (Abb. 3.13, Aufnahme B). Die von Exon 5 codierte Sequenz vermittelt also auch die Fähigkeit zur nukleären Lokalisation. Unter der Annahme, dass MSH2 mangels NLS Sequenz nur an MSH3 oder MSH6 gebunden in den Kern gelangt (vgl. 4.6.), kann die Fähigkeit zur nukleären Lokalisation in direkten Zusammenhang mit der Fähigkeit zur Heterodimerisierung gebracht werden. Aufgrund seiner Eigenschaften ist MSH2-V1 von nukleärer MMR ausgeschlossen. Wie unter 4.6. und 4.7. diskutiert ist es denkbar, dass MMR über alternatives Spleißen von

MSH2 reguliert wird, wobei Spleißen zu Gunsten von MSH2-WT die MMR Aktivität fördert und Spleißen zu Gunsten von MSH2-V1 die MMR Aktivität hemmt.

MSH3-V3

Die von den Exons 12 und 13 codierten Aminosäuresequenzen von MSH3 vermitteln die Fähigkeit zur Heterodimerisierung. Daher führt ihr Fehlen zum Verlust dieser Fähigkeit, wie anhand der ausschließlich kernständigen Proteinvariante MSH3-V3 gezeigt wurde (Abb. 3.12b; Abb. 3.13, Aufnahme D). Auch hier muss eine indirekte Beteiligung der entsprechenden Sequenz über den Erhalt einer bestimmten Proteinstruktur zugrundeliegen, da die Bildung von MutS β über Interaktionen der C-Termini von MSH2 und MSH3 erfolgt (Obmolova et al. 2000; Warren et al. 2007). Da MSH3-V3 nicht zur Bildung des funktionalen Heterodimers MutS β beitragen und keine DNA binden kann, ist für diese Proteinvariante keine Akkumulation an Orten UVA induzierter DNA Schäden nachweisbar (Abb. 3.14a, Aufnahme D). Ähnlich wie für MSH2 diskutiert könnte auch über alternatives Spleißen von MSH3 eine Regulation von MMR Aktivität stattfinden, die im Gegensatz zu MSH2 nicht die gesamte, sondern nur die von MutS β vermittelte MMR Aktivität beeinflusst. Dabei wird die MutS β abhängige MMR Aktivität über Spleißen zu Gunsten von MSH3-WT gefördert und über Spleißen zu Gunsten von MSH3-V3 gehemmt.

MSH3-V4 und MSH3-V5

Die Peptide MSH3-V4 und MSH3-V5 können ebenfalls keine Heterodimere mit MSH2 bilden (Abb. 3.12b), was in dem Fehlen von mehr als 95 % der Aminosäuresequenz des MSH3-WT Proteins begründet liegt. Eine Akkumulation dieser Peptide an UVA induzierten DNA Schäden konnte nicht beobachtet werden (Abb. 3.14a, Aufnahmen E und F). Beide Peptide sind sowohl im Kern als auch im Cytoplasma lokalisiert (Abb. 3.13, Aufnahmen E und F). Im Gegensatz zu MSH3-V5 enthält das Peptid MSH3-V4 eine PIP-Box (vgl. 3.2.3.) und *in vitro* konnte eine Interaktion mit PCNA gezeigt werden (persönliche Mitteilung von W.G. Dirks). Da die MMR über das PCNA bindende Protein p21 gehemmt wird (Umar et al. 1996), wurde die Hypothese aufgestellt, dass auch MSH3-V4 über die Bindung an PCNA

dessen Interaktionen mit MSH3 und MSH6 kompetitiv hemmt und die MMR damit herunterreguliert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Experiment zur Überprüfung dieser Hypothese durchgeführt (nicht dargestellte Daten). Dabei sollte gezeigt werden, dass bei Überexpression von MSH3-V4 weniger endogenes PCNA mit stabil exprimiertem MSH3-WT bzw. MSH6-WT co-immunpräzipitiert wird als ohne diese Überexpression. Da eine Reduktion der Menge an co-immunpräzipitiertem PCNA bei Überexpression von MSH3-V4 nicht zu beobachten war, konnte die Hypothese mit diesem Experiment nicht bestätigt werden. Anhand ihrer im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermittelten Eigenschaften, kann den Peptiden MSH3-V4 und MSH3-V5 keine Funktion zugeordnet werden.

MSH6-V3

Anhand der Variante MSH6-V3 konnte gezeigt werden, dass das Fehlen der 99 N-terminalen Aminosäuren von MSH6 weder die Heterodimerisierung noch die kernständige Lokalisation beeinträchtigt (Abb. 3.12c; Abb. 3.13, Aufnahme H). Es ist anzunehmen, dass eine Anreicherung dieser Proteinvariante an Orten UVA induzierter DNA Schäden aufgrund des Fehlens der PIP-Box ausbleibt (vgl. 3.2.3. und 4.8.2.), wodurch die Bedeutung der Interaktion mit PCNA bei der Antwort auf die entsprechenden DNA Schäden gezeigt wurde. Möglicherweise spielt MSH6-V3 eine Rolle bei MMR abhängigen Prozessen, die unabhängig von PCNA stattfinden können oder müssen. Ein Beispiel hierfür sind Rekombinationsprozesse. Dabei ist eine Detektion von Fehlpaarungen und IDL Strukturen essentiell, um die Rekombination nicht homologer Sequenzen zu verhindern. Da in MMR defizienten gegenüber MMR profizienten Zellen eine erhöhte Rekombinationsrate festgestellt wurde (de Wind et al. 1995; Chen et al. 2001), kann davon ausgegangen werden, dass die MMR Proteine an diesem Prozess beteiligt sind. Es wird angenommen, dass sie den Schritt der Schenkelwanderung (*branch migration*) hemmen können. Die Rekombination fast homologer Sequenzen, die als homeolog bezeichnet werden, geht mit Genkonversion einher. In MMR defizienten Zellen sind die von Genkonversion betroffenen Bereiche länger als in MMR profizienten Zellen (Chen & Jinks-Robertson 1998). Genkonversion findet also auch in Abwesenheit von MMR Proteinen statt, was darauf hindeutet, dass sie nicht auf von den MMR Proteinen initiierten Reparaturprozessen beruht. Da in Abwesenheit von MMR Proteinen längere Sequenzabschnitte von der Genkonversion betroffen sind als in

Anwesenheit von MMR Proteinen, lässt sich schlussfolgern, dass die MMR Proteine sogar an der Hemmung des zur Genkonversion führenden Prozesses beteiligt sind.

Denkbar ist, dass die MMR Proteine Fehlpaarungen und IDL Strukturen markieren, indem sie sie binden, ohne eine Reparatur zu initiieren. Die Markierungen werden dann von einem zweiten Proteinkomplex erkannt, woraufhin die Fehlpaarungen und IDL Strukturen in Bewegungsrichtung der Schenkelwanderung nach und nach prozessiert werden. Dabei bestimmt die Häufigkeit der Markierungen über den Abbruch des Rekombinationsprozesses entweder vor oder während der Schenkelwanderung. Derartige Markierungen könnten von einem Komplex aus MSH2 und MSH6-V3 vorgenommen werden, da dieser Komplex aller Wahrscheinlichkeit nach Fehlpaarungen binden, aufgrund des Fehlens der PIP-Box von MSH6 aber keinen Reparaturprozess initiieren kann. Unter 4.8.2. wurde diskutiert, dass die Bindung von MutS α an Fehlpaarungen in Abhängigkeit von PCNA erfolgt, weshalb keine Akkumulation von MSH6-V3 an UVA induzierten DNA Schäden detektierbar ist (Abb. 3.14, Aufnahme H). Daher erscheint es widersprüchlich, dass ein Dimer aus MSH2 und MSH6-V3 ohne Mitwirkung von PCNA erfolgreich an Fehlpaarungen bindet. Dieser Widerspruch lässt sich jedoch durch die Hypothese entkräften, dass das Heterodimer MSH2·MSH6-V3 generell eine relativ hohe Affinität zu Fehlpaarungen hat und diese ohne Mitwirkung von PCNA zu binden vermag. MSH2·MSH6 hingegen hat eine geringere Affinität, die aber um ein Vielfaches erhöht wird, wenn das Heterodimer nach Kontakt mit PCNA an die Fehlpaarung bindet. Die Affinität ist dann so hoch, dass eine Bindung von MSH2·MSH6-V3 kompetitiv gehemmt wird.

4.10. Zellzyklusabhängige Regulation von MSH2, MSH3 und MSH6

Eine zellzyklusabhängige Regulation konnte für das Transkript MSH2-WT (Abb. 3.17b) sowie für die Proteine MSH2, MSH3 und MSH6 gezeigt werden (Abb. 3.16). Dabei ist die tatsächliche Regulation vermutlich stärker, als es anhand der gewonnenen Daten zum Ausdruck kommt, da nur ca. 50 % der untersuchten Zellen synchronisiert werden konnten (Abb. 3.15).

Bei der Untersuchung der zellzyklusabhängigen Regulation der MMR Aktivität auf Transkriptebeine lag der Fokus auf den Transkripten MSH2-WT und MSH2-V1, da MSH2 als Komponente von MutS α und MutS β den stärksten Einfluss auf die MMR Aktivität ausübt.

Aus der Untersuchung geht hervor, dass sich die Menge an MSH2-WT Transkript im Verlauf des Zellzyklus deutlich verändert, während die Menge an MSH2-V1 Transkript durchweg konstant ist. Im Verlauf des Zellzyklus variiert also einerseits die Gesamtmenge an MSH2 Transkript und andererseits das Verhältnis von MSH2-WT zu MSH2-V1 Transkript. Daher muss die zellzyklusabhängige Regulation der MSH2 Transkripte sowohl auf Ebene der Transkription selbst als auch auf Ebene der Prä-mRNA-Prozessierung erfolgen. Darüber hinaus zeigen die Untersuchungen, dass die Menge an Wildtyptranskript in synchronisierten Zellen im Gegensatz zu unbehandelten Zellen grundsätzlich erniedrigt ist, was für das Transkript MSH2-V1 nicht gilt. Daraus lässt sich schließen, dass die Behandlung mit Colcemid und/ oder Aphidicolin Einfluss auf die Transkription des MSH2 Gens und auf das alternative Spleißen nimmt. Dabei wird die Transkription gehemmt und das alternative Spleißen erfolgt verstärkt zu Gunsten der Transkriptvariante MSH2-V1, so dass deren auf der verringerten MSH2 Transkription basierende Abnahme ausgeglichen wird. Dies steht im Einklang mit den unter 4.7. diskutierten Beobachtungen von Marquez et al. (2004), die ebenfalls als Hinweis auf ein verstärktes Spleißen zu Gunsten der Transkriptvariante MSH2-V1 nach Einwirkung geringer Dosen einiger Zellgifte gedeutet werden können. Es ist anzunehmen, dass sich der festgestellte Einfluss der Zellgifte Colcemid und/ oder Aphidicolin systematisch auf die einzelnen Messdaten niederschlägt, weshalb die zellzyklusabhängige Regulation des MSH2-WT Transkripts in seiner Qualität nicht verändert wird. Diese Annahme bestätigt sich beim Vergleich der in der vorliegenden Arbeit generierten Daten zur zellzyklusabhängigen Regulation des MSH2-WT Transkripts mit entsprechenden Daten, die von Whitfield et al. (2002) erhoben wurden. In beiden Arbeiten wurde die maximale Menge an MSH2-WT bzw. an MSH2 Transkript in der S-Phase detektiert. Dabei hatten Whitfield et al. (2002) die zellzyklusabhängige Transkription von MSH2 über cDNA *microarrays* nach Zellsynchronisation mit verschiedenen Zellgiften untersucht. Darüber hinaus hat diese Gruppe die Transkription von MSH3 und MSH6 im Verlauf des Zellzyklus analysiert und festgestellt, dass sie für beide Gene konstitutiv erfolgt.

Auf Proteinebene wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit maximale Konzentrationen von MSH2, MSH3 und MSH6 in S-Phase Zellen detektiert. Diese Ergebnisse stehen sowohl mit den eigenen Daten aus der Analyse der zellzyklusabhängigen Regulation auf Transkriptebezug in Einklang, als auch mit den von Schroering et al. (2007) publizierten

Daten. Diese Gruppe hatte die Zellsynchronisation mithilfe der als stressfrei geltenden Methoden der Dichtearretierung bzw. differentiellen Zentrifugation herbeigeführt und die Proteinkonzentrationen von MSH2 und MSH6 mittels spezifischer Antikörper in nukleären und cytoplasmatischen Fraktionen ermittelt. Generell geht die Hochregulation der MMR Komponenten während der S-Phase konform mit der Tatsache, dass MMR hauptsächlich während der DNA Replikation stattfindet. Die Herunterregulierung in den übrigen Zellzyklusphasen kann erforderlich sein, da hohe Konzentrationen an MMR Proteinen zur Induktion von Apoptose führen (Zhang et al. 1999). Die Toleranz gegenüber höheren Konzentrationen an MMR Proteinen in der S-Phase lässt sich möglicherweise damit erklären, dass in erfolgreiche Reparaturprozesse involvierte MMR Proteine nicht gleichzeitig an der Induktion von Apoptose beteiligt sind.

Eine Möglichkeit der Regulation von MMR ist auf Proteinebene anzunehmen, da selbst die unter Kontrolle eines CMV Promotors rekombinant exprimierten MSH Fusionsproteine reguliert werden, wie in den unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten verschiedener Zellen eines Einzelklons zum Ausdruck kommt (Abb. 3.13, Aufnahmen D und H). Da die Gene MSH3 und MSH6 konstitutiv transkribiert werden, muss die Regulation ihrer Produkte ausschließlich auf posttranskriptioneller Ebene erfolgen, unter anderem über eine MSH2 abhängige Stabilisierung bzw. Destabilisierung der Proteine wie unter 4.2. diskutiert. Alles in allem bestehen deutliche Hinweise darauf, dass die MMR Aktivität über MSH2 reguliert werden kann, und dass die Regulation von MSH2 sowohl auf transkriptioneller als auch auf posttranskriptioneller Ebene stattfindet. Dies bekräftigt die unter 4.6. formulierte Hypothese, dass der Spleißprozess zu Gunsten des Wildtyptranskripts oder der Transkriptvariante von MSH2 Anteil an der Feinabstimmung der MMR Funktionen in der Zelle hat.

4.11. Abschließende Betrachtung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Modellsysteme zur *in vivo* Erforschung der MMR etabliert. Sie beruhen auf der stabilen Expression von fluoreszenzmarkierten MSH Proteinen in humanen Zelllinien. Die Etablierung von Einzelklonen gewährleistet einen einheitlichen genetischen Hintergrund in den einzelnen Zellpopulationen. Die Existenz verschiedener Einzelklone je Expressionskonstrukt ermöglicht deren Vergleich. Dadurch kann sichergestellt werden, dass beobachtete Eigenschaften der Zellen auf das rekombinante

Protein und nicht auf die Veränderung des genetischen Hintergrunds zurückzuführen sind, die auf der Insertion des Fremdgens an einem beliebigen Ort des Genoms beruhen. Über den Einsatz dieses Modellsystems wurden neue Erkenntnisse über MMR gewonnen. So konnte erstens *in vivo* eine Beteiligung von MutS α und MutS β an der Zellreaktion auf UVA induzierte DNA Schäden gezeigt werden. Zweitens konnte darüber hinaus erstmals eine Kinetik erstellt werden, die die Geschwindigkeit und Dauer einer MMR Reaktion auf spezifisch induzierte DNA Schäden beschreibt. Für die Gene MSH2, MSH3 und MSH6 wurden die fünf alternativ gespleißten Transkripte MSH2-V1, MSH3-V3, MSH3-V4, MSH3-V5 und MSH6-V3 nachgewiesen. Außerdem wurden Hinweise auf die Existenz der endogen translatierten Proteinisoformen MSH2-V1, MSH3-V3 und MSH6-V3 erhalten. Es wurden Einzelklone etabliert, die die den Transkriptvarianten entsprechenden Proteinvarianten mit Fluoreszenzproteinen gekoppelt stabil exprimieren. Mithilfe dieser Zellen wurde eine herausragende Eigenschaft für MSH2-V1 festgestellt, denn dieses ist das einzige der untersuchten MSH Proteine, das ausschließlich im Cytoplasma lokalisiert ist und damit nicht an nukleärer MMR beteiligt sein kann.

Um die nachgewiesenen Proteinisoformen definitiv den Transkriptvarianten MSH2-V1, MSH3-V3 und MSH6-V3 zuordnen zu können, sollten die detektierten Proteine mittels Massenspektroskopie oder spezifischer Antikörper analysiert werden. Die aus dem UVA Experiment gewonnenen Erkenntnisse ließen sich ausweiten, indem über Co-Immunpräzipitationen festgestellt wird, ob direkte Interaktionen zwischen MMR und NER bzw. BER Komponenten stattfinden. Die etablierten Modellsysteme könnten zur Untersuchung der Beteiligung von MutS α und MutS β an der Zellantwort auf verschiedene mutagene Strahlungen und Chemikalien genutzt werden. Denkbar ist eine Ergänzung der Modellsysteme um MLH1 und PMS2 exprimierende Zellen, um die Beteiligung von MutL α zu untersuchen. Endgültig nachzuweisen bleibt, ob alternatives Spleißen von MSH2 Transkripten Anteil an der Regulation der Aktivität von MMR hat. Zu diesem Zweck könnte die zur spezifischen Quantifizierung von MSH2-WT und MSH2-V1 Transkripten etablierte Real-Time-PCR eingesetzt werden, um Veränderungen in den Konzentrationen der beiden Transkripte unter Einfluss verschiedener Mutagene zu untersuchen.

5. Zusammenfassung

Die Fehlpaarungsreparatur (*mismatch repair* - MMR) ist der einzige DNA Reparaturweg, der auf die Korrektur von Replikationsfehlern spezialisiert ist. Darüber hinaus ist die MMR an der Antwort auf diverse DNA Schäden beteiligt, insbesondere an der Induktion von Zellzyklusarrest und Apoptose. Die Erkennung von während der Replikation oder der Reparatursynthese entstehenden DNA Fehlern erfolgt über die Heterodimere MutS α und MutS β , die von den Proteinen MSH2 und MSH6 bzw. MSH2 und MSH3 gebildet werden.

Um die MSH Proteine *in vivo* untersuchen zu können, wurden die entsprechenden cDNAs in bi- und tricistronische Vektoren kloniert. Deren stabile Transfektion in die zwei humanen Zelllinien 293 und HT-1080 vermittelt die Expression der mit spezifischen Fluorochromen fusionierten MSH Proteine. Um genetisch einheitliche Zellpopulationen zu erhalten, wurden Einzelklone etabliert. Durch den Nachweis der Bindung endogener Partner und der Beteiligung an der Zellantwort auf UVA induzierte DNA Schäden wurde die Funktionalität der rekombinanten Wildtypproteine gezeigt. Sie akkumulieren alle zusammen mit PCNA am Ort der induzierten DNA Schäden nach UVA Bestrahlung. Dabei erreicht ihre Akkumulation wie die von PCNA ihr Maximum nach 5 Minuten.

In dieser Arbeit wurden die Transkriptvarianten MSH2-V1, MSH3-V3, MSH3-V4, MSH3-V5 und MSH6-V3 nachgewiesen, von denen alle bis auf MSH2-V1 erstmals beschrieben werden. Unter den entsprechenden Proteinvarianten weist MSH2-V1 besondere Eigenschaften auf, da sie als einzige vom Zellkern ausgeschlossen ist. Nur die Proteinvariante MSH6-V3 ist zur Heterodimerbildung befähigt, akkumuliert aber ebenso wenig an UVA induzierten DNA Schäden wie die übrigen Proteinvarianten. Die Wildtypproteine MSH2, MSH3 und MSH6 sind am stärksten in der S-Phase exprimiert, wobei für MSH2 auch eine verstärkte Transkription in der S-Phase nachgewiesen werden konnte.

Das Modellsystem zur Durchführung von *in vivo* Untersuchungen an den humanen MMR Komponenten MSH2, MSH3 und MSH6 wurde erfolgreich etabliert und steht weiteren Studien zur MMR Aktivität im Zusammenhang mit verschiedenen Mutagenen zur Verfügung. Die unterschiedlichen Eigenschaften der Proteinvarianten lassen vermuten, dass alternatives Spleißen einen Anteil an der Regulation von MMR Aktivität und/ oder Funktionen hat.

6. Literaturverzeichnis

Acharya S., Wilson T., Gradia S., Kane M.F., Guerrette S., Marsischky G.T., Kolodner R., Fishel R. (1996): hMSH2 forms specific mispair-binding complexes with hMSH3 and hMSH6. - PNAS 93: 13629-13634.

Adamson A.W., Beardsley D.I., Kim W.-J., Gao Y., Baskaran R., Brown K.D. (2005): Methylator-induced, Mismatch Repair-dependent G₂ Arrest Is Activated through Chk1 and Chk2. - Molecular Biology of the Cell 16: 1513-1526.

Agar N.S., Halliday G.M., Barnetson R., Ananthaswamy H.N., Wheeler M., Jones A.M. (2004): The basal layer in human squamous tumors harbors more UVA than UVB fingerprint mutations: A role for UVA in human skin carcinogenesis. - PNAS 101 (14): 4954-4959.

Aquilina G., Crescenzi M., Bignami M. (1999): Mismatch repair, G₂/M cell cycle arrest and lethality after DNA damage. - Carcinogenesis 20 (12): 2317-2325.

Belloni M., Uberti D., Rizzini C., Ferrari-Toninelli G., Rizzonelli P., Jiricny J., Spano P., Memo M. (1999) : Distribution and kainate-mediated induction of the DNA mismatch repair protein MSH2 in rat brain. - Neuroscience 94 (4): 1323-1331.

Birnboim H.C., Doly J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. - Nucleic Acids Research 7 (6): 1513-1523.

Bjornson K.P., Blackwell L.J., Sage H., Baitinger C., Allen D., Modrich P. (2003): Assembly and molecular activities of the MutS tetramer. - The Journal of Biological Chemistry 278 (36): 34667-34673.

Blencowe B.J. (2006): Alternative Splicing: New Insights from Global Analyses. - Cell 126: 37-47.

Boland C.R., Thibodeau S.N., Hamilton S.R., Sidransky D., Eshleman J.R., Burt R.W., Meltzer S.J., Rodriguez-Bigas M.A., Fodde R., Ranzani G.N., Srivastava S. (1998): A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for Cancer Detection and Familial Predisposition: Development of International Criteria for the Determination of Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. - Cancer Research 58: 5248-5257.

Brieger A., Trojan J., Raedle J., Plotz G., Zeuzem S. (2002): Transient mismatch repair gene transfection for functional analysis of genetic hMLH1 and hMSH2 variants. - Gut 51: 677-684.

Brown K.D., Rathi A., Kamath R., Beardsley D.I., Zhan Q., Mannino J.L., Baskaran R. (2003): The mismatch repair system is required for S-phase checkpoint activation. - Nature Genetics 33: 80-84.

- Burset M., Seledtsov I.A., Solovyev V.V. (2000): Analysis of canonical and non-canonical splice sites in mammalian genomes. - *Nucleic Acids Research* 28 (21): 4364-4375.
- Capel E., Fléjou J.-F., Hamelin R. (2007): Assessment of MLH1 promoter methylation in relation to gene expression requires specific analysis. - *Oncogene* 26 (54): 7596-7600.
- Castrilli G., Piantelli M., Artese L., Perfetti G., Rubini C., Fioroni M., Ranelletti F.O., Piattelli A. (2001): Expression of hMSH2 and hMLH1 proteins of the human DNA mismatch repair system in ameloblastoma. - *Journal of Oral Pathology and Medicine* 30 (5): 305-308.
- Chen S., Bigner S.H., Modrich P. (2001): High rate of *CAD* gene amplification in human cells deficient in MLH1 or MSH6. - *PNAS* 98 (24): 13802-13807.
- Chen W., Jinks-Robertson S. (1998): Mismatch Repair Proteins Regulate Heteroduplex Formation during Mitotic Recombination in Yeast. - *Molecular and Cellular Biology* 18 (11): 6525-6537.
- Chi N.W., Kolodner R.D. (1994): Purification and characterization of MSH1, a yeast mitochondrial protein that binds to DNA mismatches. - *The Journal of Biological Chemistry* 269 (47): 29984-29992.
- Chiapperino D., Cai M., Sayer J.M., Yagi H., Kroth H., Masutani C., Hanaoka F., Jerina D.M., Cheh A.M. (2005): Error-prone Translesion Synthesis by Human DNA Polymerase η on DNA-containing Deoxyadenosine Adducts of 7,8-Dihydroxy-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[*a*]pyrene. - *The Journal of Biological Chemistry* 280 (48): 39684-39692.
- Chomczynski P., Sacchi N. (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. - *Analytical Biochemistry* 162 (1): 156-159.
- Christmann M., Kaina B. (2000): Nuclear Translocation of Mismatch Repair Proteins MSH2 and MSH6 as a Response of Cells to Alkylating Agents. - *The Journal of Biological Chemistry* 275 (46): 36256-36262.
- Christmann M., Tomicic M.T., Kaina B. (2002): Phosphorylation of mismatch repair proteins MSH2 and MSH6 affecting MutS α mismatch-binding activity. - *Nucleic Acids Research* 30 (9): 1959-1966.
- Clarke L.A., Jordan P., Boavida M.G. (2000): Cell type specificity in alternative splicing of the human mismatch repair gene *hMSH2*. - *European Journal of Human Genetics* 8: 347-352.
- Cocquet J., Chong A., Zhang G., Veitia R.A. (2006): Reverse transcriptase template switching and false alternative transcripts. - *Genomics* 88 (1): 127-131.
- Constantin N., Dzantiev L., Kadyrov F.A., Modrich P. (2005): Human mismatch repair: reconstitution of a nick-directed bidirectional reaction. - *The Journal of Biological Chemistry* 280 (48): 39752-39761.

Cramer P., Pesce C.G., Baralle F.E., Kornblihtt A.R. (1997): Functional association between promoter structure and transcript alternative splicing. - PNAS 94: 11456-11460.

Cunningham J.M., Christensen E.R., Tester D.J., Kim C.Y., Roche P.C., Burgart L.J., Thibodeau S.N. (1998): Hypermethylation of the hMLH1 promoter in colon cancer with microsatellite instability. - Cancer Research 58 (15): 3455-3460.

de Boer J., Hoeijmakers J.H.J. (2000): Nucleotide excision repair and human syndromes. - Carcinogenesis 21 (3): 453-460.

de Silva I.U., McHugh P.J., Clingen P.H., Hartley J.A. (2000): Defining the Roles of Nucleotide Excision Repair and Recombination in the Repair of DNA Interstrand Cross-Links in Mammalian Cells. - Molecular and Cellular Biology 20 (21): 7980-7990.

de Wind N., Dekker M., Berns A., Radman M., te Riele H. (1995): Inactivation of the Mouse *Msh2* Gene Results in Mismatch Repair Deficiency, Methylation Tolerance, Hyperrecombination, and Predisposition to Cancer. - Cell 82: 321-330.

Dirks W., Fähnrich S., Estella I., Drexler H.G. (2004): Microsatellite BAT26 Instability in Cell Lines: Correlation with Expression of MMR Genes MLH1, MSH-2 and PMS-2. - Poster, DNA Repair, Ulm (September 2004).

Dirks W., Wirth M., Hauser H. (1993): Dicistronic transcription units for gene expression in mammalian cells. - Gene 128: 247-249.

Dufner P., Marra G., Räsche M., Jiricny J. (2000): Mismatch Recognition and DNA-dependent Stimulation of the ATPase Activity of hMutSα Is Abolished by a Single Mutation in the hMSH6 Subunit. - The Journal of Biological Chemistry 275 (47): 36550-36555.

Dzantiev L., Constantin N., Genschel J., Iyer R.R., Burgers P.M., Modrich P. (2004): A Defined Human System that Supports Bidirectional Mismatch-Provoked Excision. - Molecular Cell 15: 31-41.

Fang W.H., Modrich P. (1993): Human strand-specific mismatch repair occurs by a bidirectional mechanism similar to that of the bacterial reaction. - The Journal of Biological Chemistry 268 (16): 11838-11844.

Felton K.E.A., Gilchrist D.M., Andrew S.E. (2007) a: Constitutive deficiency in DNA mismatch repair. - Clinical Genetics 71: 483-498.

Felton K.E.A., Gilchrist D.M., Andrew S.E. (2007) b: Constitutive deficiency in DNA mismatch repair: is it time for Lynch III? - Clinical Genetics 71: 499-500.

Fritzell J.A., Narayanan L., Baker S.M., Bronner C.E., Andrew S.E., Prolla T.A., Bradley A., Jirik F.R., Liskay R.M., Glazer P.M. (1997): Role of DNA Mismatch Repair in the Cytotoxicity of Ionizing Radiation. - *Cancer Research* 57: 5143-5147.

Genschel J., Bazemore L.R., Modrich P. (2002): Human Exonuclease I Is Required for 5' and 3' Mismatch Repair. - *The Journal of Biological Chemistry* 277 (15): 13302-13311.

Genschel J., Littman S.J., Drummond J.T., Modrich P. (1998): Isolation of MutS β from Human Cells and Comparison of the Mismatch Repair Specificities of MutS β and MutS α . - *The Journal of Biological Chemistry* 273 (31): 19895-19901.

Genschel J., Modrich P. (2003): Mechanism of 5'-directed excision in human mismatch repair. - *Molecular Cell* 12 (5): 1077-1086.

Genuardi M., Viel A., Bonora D., Capozzi E., Bellacosa A., Leonardi F., Valle R., Ventura A., Pedroni M., Boiocchi M., Neri G. (1998): Characterization of *MLH1* and *MSH2* alternative splicing and its relevance to molecular testing of colorectal cancer susceptibility. - *Human Genetics* 102: 15-20.

Goldberg A.L. (2003): Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. - *Nature* 426 (6968): 895-899.

Gu L., Hong Y., McCulloch S., Watanabe H., Li G.M. (1998): ATP-dependent interaction of human mismatch repair proteins and dual role of PCNA in mismatch repair. - *Nucleic Acids Research* 26 (5): 1173-1178.

Harris A.L., Karran P., Lindahl T. (1983): O⁶-Methylguanine-DNA Methyltransferase of Human Lymphoid Cells: Structural and Kinetic Properties and Absence in Repair-deficient Cells. - *Cancer Research* 43: 3247-3252.

Herman J.G., Graff J.R., Myöhänen S., Nelkin B.D., Baylin S.B. (1996): Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. - *PNAS* 93: 9821-9826.

Hoang J.-M., Cottu P.H., Thuille B., Salmon R.J., Thomas G., Hamelin R. (1997): BAT-26, an indicator of the replication error phenotype in colorectal cancers and cell lines. - *Cancer Research* 57: 300-303.

Ichikawa M., Nakane H., Marra G., Corti C., Jiricny J., Fitch M., Ford J.M., Ikejima M., Shimada T., Yoshino M., Takeuchi S., Nakatsu Y., Tanaka K. (2000): Decreased UV sensitivity, mismatch repair activity and abnormal cell cycle checkpoints in skin cancer cell lines derived from UVB-irradiated XPA-deficient mice. - *Mutation Research* 459: 285-298.

Iyer R.R., Pluciennik A., Burdett V., Modrich P.L. (2006): DNA Mismatch Repair: Functions and Mechanisms. - *Chemical Reviews* 106: 302-323.

Jiricny J. (1998): Replication errors: cha(lle)nging the genome. - The EMBO Journal 17 (22): 6427-6436.

Jiricny J. (2000): Mismatch repair: The praying hands of fidelity. - Current Biology 10: R788-R790.

Jiricny J. (2006): The multifaceted mismatch-repair system. - Nature Reviews. Molecular Cell Biology 7 (5): 335-346.

Johnson J.M., Castle J., Garrett-Engele P., Kan Z., Loerch P.M., Armour C.D., Santos R., Schadt E.E., Stoughton R., Shoemaker D.D. (2003): Genome-wide survey of human alternative pre-mRNA splicing with exon junction microarrays. - Science 302 (5653): 2141-2144.

Kadyrov F.A., Dzantiev L., Constantin N., Modrich P. (2006): Endonucleolytic Function of MutL α in Human Mismatch Repair. - Cell 126: 297-308.

Kawakami T., Shiina H., Igawa M., Deguchi M., Nakajima K., Ogishima T., Tokizane T., Urakami S., Enokida H., Miura K., Ishii N., Kane C.J., Carroll P.R., Dahiya R. (2004): Inactivation of the hMSH3 mismatch repair gene in bladder cancer. - Biochemical and Biophysical Research Communications 325: 934-942.

Kleczkowska H.E., Marra G., Lettieri T., Jiricny J. (2001): hMSH3 and hMSH6 interact with PCNA and colocalize with it to replication foci. - Genes & Development 15: 724-736.

Kornblihtt A.R. (2005): Promoter usage and alternative splicing. - Current Opinion in Cell Biology 17: 262-268.

Krawczak M., Reiss J., Cooper D.N. (1992): The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. - Human Genetics 90 (1-2): 41-54.

Lan L., Nakajima S., Oohata Y., Takao M., Okano S., Masutani M., Wilson S.H., Yasui A. (2004): *In situ* analysis of repair processes for oxidative DNA damage in mammalian cells. - PNAS 101 (38): 13738-13743.

Lau P.J., Kolodner R.D. (2003): Transfer of the MSH2-MSH6 Complex from Proliferating Cell Nuclear Antigen to Mismatched Bases in DNA. - The Journal of Biological Chemistry 278 (1): 14-17.

Lettieri T., Marra G., Aquilina G., Bignami M., Crompton N.E.A., Palombo F., Jiricny J. (1999): Effect of *hMSH6* cDNA expression on the phenotype of mismatch repair-deficient colon cancer cell line HCT15. - Carcinogenesis 20 (3): 373-382.

- Lin D.P., Wang Y., Scherer S.J., Clark A.B., Yang K., Avdievich E., Jin B., Werling U., Parris T., Kurihara N., Umar A., Kucherlapati R., Lipkin M., Kunkel T.A., Edelmann W. (2004): An Msh2 Point Mutation Uncouples DNA Mismatch Repair and Apoptosis. - *Cancer Research* 64: 517-522.
- Lin Y.L., Shivji M.K., Chen C., Kolodner R., Wood R.D., Dutta A. (1998): The evolutionarily conserved zinc finger motif in the largest subunit of human replication protein A is required for DNA replication and mismatch repair but not for nucleotide excision repair. - *The Journal of Biological Chemistry* 273 (3): 1453-1461.
- Loukola A., Eklin K., Laiho P., Salovaara R., Kristo P., Järvinen H., Mecklin J.-P., Launonen V., Aaltonen L.A. (2001): Microsatellite Marker Analysis in Screening for Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (HNPCC). - *Cancer Research* 61: 4545-4549.
- Ma Y., Lu H., Schwarz K., Lieber M.R. (2005): Repair of Double-Strand DNA Breaks by the Human Non-Homologous DNA End Joining Pathway. - *Cell Cycle* 4 (9): 1193-1200.
- Makarov E.M., Makarova O.V., Urlaub H., Gentzel M., Will C.L., Wilm M., Lührmann R. (2002): Small Nuclear Ribonucleoprotein Remodeling During Catalytic Activation of the Spliceosome. - *Science* 298: 2205-2208.
- Maniatis T., Tasic B. (2002): Alternative pre-mRNA splicing and proteome expansion in metazoans. - *Nature* 418 (6894): 236-243.
- Marquez N., Chappell S.C., Sansom O.J., Clarke A.R., Court J., Errington R.J., Smith P.J. (2003): Single cell tracking reveals that Msh2 is a key component of an early-acting DNA damage-activated G2 checkpoint. - *Oncogene* 22: 7642-7648.
- Marquez N., Chappell S.C., Sansom O.J., Clarke A.R., Teesdale-Spittle P., Errington R.J., Smith P.J. (2004): Microtubule Stress Modifies Intra-Nuclear Location of Msh2 in Mouse Embryonic Fibroblasts. - *Cell Cycle* 3 (5): 662-671.
- Marra G., Boland C.R. (1995): Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer: the Syndrome, the Genes, and Historical Perspectives. - *Journal of the National Cancer Institute* 87 (15): 1114-1125.
- Masutani C., Kusumoto R., Yamada A., Dohmae N., Yokoi M., Yuasa M., Araki M., Iwai S., Takio K., Hanaoka F. (1999): The XPV (xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase eta. - *Nature* 399 (6737): 700-704.
- Mazurek A., Berardini M., Fishel R. (2002): Activation of human MutS homologs by 8-oxo-guanine DNA damage. - *The Journal of Biological Chemistry* 277 (10): 8260-8266.
- Moldovan G.-L., Pfander B., Jentsch S. (2007): PCNA, the Maestro of the Replication Fork. - *Cell* 129: 665-679.

Mori Y., Shiwaku H., Fukushima S., Wakatsuki S., Sato M., Nukiwa T., Horii A. (1997): Alternative splicing of *hMSH2* in normal human tissues. - *Human Genetics* 99: 590-595.

Neuberger M.S., Rada C. (2007): Somatic hypermutation: activation-induced deaminase for C/G followed by polymerase η for A/T. - *The Journal of Experimental Medicine* 204 (1): 7-10.

Newman A.J. (1997): The role of U5 snRNP in pre-mRNA splicing. - *The EMBO Journal* 16 (19): 5797-5800.

Obmolova G., Ban C., Hsieh P., Yang W. (2000): Crystal structures of mismatch repair protein MutS and its complex with a substrate DNA. - *Nature* 407: 703-710.

Padgett R.A., Grabowski P.J., Konarska M.M., Seiler S., Sharp P.A. (1986): Splicing of messenger RNA precursors. - *Annual Review of Biochemistry* 55: 1119-1150.

Pagani F., Stuanı C., Zuccato E., Kornblihtt A.R. (2003): Promoter Architecture Modulates CFTR Exon 9 Skipping. - *The Journal of Biological Chemistry* 278 (3): 1511-1517.

Park S.-J., Rashid A., Lee J.-H., Kim S.G., Hamilton S.R., Wu T.-T. (2003): Frequent CpG Island Methylation in Serrated Adenomas of the Colorectum. - *American Journal of Pathology* 162 (3): 815-822.

Parsons R., Myeroff L.L., Liu B., Willson J.K., Markowitz S.D., Kinzler K.W., Vogelstein B. (1995): Microsatellite instability and mutations of the transforming growth factor beta type II receptor gene in colorectal cancer. - *Cancer Research* 55 (23): 5548-5550.

Pedroni M., Tamassia M.G., Percesepe A., Roncucci L., Benatti P., Lanza G. Jr., Gafà R., Di Gregorio C., Fante R., Losi L., Gallinari L., Scorcioni F., Vaccina F., Rossi G., Cesinaro A.M., Ponz de Leon M. (1999): Microsatellite instability in multiple colorectal tumors. - *International Journal of Cancer* 81 (1): 1-5.

Peltomäki P.T. (1994): Genetic basis of hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma (HNPCC). - *Annals of Medicine* 26 (3): 215-219.

Peltomäki P. (2001): Deficient DNA mismatch repair: a common etiologic factor for colon cancer. - *Human Molecular Genetics* 10 (7): 735-740.

Peltomäki P. (2005): Lynch syndrome genes. - *Familial Cancer* 4: 227-232.

Peltomäki P., Vasen H. (2004): Mutations associated with HNPCC predisposition - Update of ICG-HNPCC/InSiGHT mutation database. - *Disease Markers* 20: 269-276.

Pyatt R., Chadwick R.B., Johnson C.K., Adebamowo C., de la Chapelle A., Prior T.W. (1999): Polymorphic variation at the BAT-25 and BAT-26 loci in individuals of African origin. - *The American Journal of Pathology* 155: 349-353.

- Ramilo C., Gu L., Guo S., Zhang X., Patrick S.M., Turchi J.J., Li G.-M. (2002): Partial Reconstitution of Human DNA Mismatch Repair In Vitro: Characterization of the Role of Human Replication Protein A. - *Molecular and Cellular Biology* 22 (7): 2037-2046.
- Richter C., Park J.-W., Ames B.N. (1988): Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. - *PNAS* 85: 6465-6467.
- Saleh-Gohari N., Helleday T. (2004): Conservative homologous recombination preferentially repairs DNA double-strand breaks in the S phase of the cell cycle in human cells. - *Nucleic Acids Research* 32 (12): 3683-3688.
- Samowitz W.S., Slattery M.L., Potter J.D., Leppert M.F. (1999): BAT-26 and BAT-40 instability in colorectal adenomas and carcinomas and germline polymorphisms. - *The American Journal of Pathology* 154: 1637-1641.
- Sancar A., Lindsey-Boltz L.A., Ünsal-Kaçmaz K., Linn S. (2004): Molecular Mechanisms of Mammalian DNA Repair and the DNA Damage Checkpoints. - *Annual Review of Biochemistry* 73: 39-85.
- Schmutte C., Marinescu R.C., Sadoff M.M., Guerrette S., Overhauser J., Fishel R. (1998): Human exonuclease I interacts with the mismatch repair protein hMSH2. - *Cancer Research* 58 (20): 4537-4542.
- Schroering A.G., Edelbrock M.A., Richards T.J., Williams K.J. (2007): The cell cycle and DNA mismatch repair. - *Experimental Cell Research* 313: 292-304.
- Setlow R.B. (1974): The Wavelengths in Sunlight Effective in Producing Skin Cancer: A Theoretical Analysis. - *PNAS* 71 (9): 3363-3366.
- Shiwaku H.O., Wakatsuki S., Mori Y., Fukushima S., Horii A. (1997): Alternative Splicing of *GTBP* in Normal Human Tissues. - *DNA Research* 4: 359-362.
- Sugnet C.W., Srinivasan K., Clark T.A., O'Brien G., Cline M.S., Wang H., Williams A., Kulp D., Blume J.E., Haussler D., Ares M. (2006): Unusual Intron Conservation near Tissue-Regulated Exons Found by Splicing Microarrays. - *PLoS Computational Biology* 2 (1): e4.
- Thomas D.C., Roberts J.D., Kunkel T.A. (1991): Heteroduplex Repair in Extracts of Human HeLa Cells. - *The Journal of Biological Chemistry* 266 (6): 3744-3751.
- Umar A., Boyer J.C., Thomas D.C., Nguyen D.C., Risinger J.I., Boyd J., Ionov Y., Perucho M., Kunkel T.A. (1994): Defective heteroduplex repair in extracts of colorectal and endometrial cancer cell lines exhibiting microsatellite instability. - *The Journal of Biological Chemistry* 269: 14367-14370.

- Umar A., Buermeyer A.B., Simon J.A., Thomas D.C., Clark A.B., Liskay R.M., Kunkel T.A. (1996): Requirement for PCNA in DNA Mismatch Repair at a Step Preceding DNA Resynthesis. - *Cell* 87: 65-73.
- van Oosten M., Stout G.J., Backendorf C., Rebel H., de Wind N., Darroudi F., van Kranen H.J., de Gruijl F.R., Mullenders L.H. (2005): Mismatch repair protein Msh2 contributes to UVB-induced cell cycle arrest in epidermal and cultured mouse keratinocytes. - *DNA Repair* 4 (1): 81-89.
- Venables J.P., Burn J. (2006): EASI-enrichment of alternatively spliced isoforms. - *Nucleic Acids Research* 34 (15): e103 (4 Seiten).
- Wang H., Lawrence C.W., Li G.-M., Hays J.B. (1999): Specific Binding of Human MSH2-MSH6 Mismatch-Repair Protein Heterodimers to DNA Incorporating Thymine- or Uracil-containing UV Light Photoproducts Opposite Mismatched Bases. - *The Journal of Biological Chemistry* 274 (24): 16894-16900.
- Wang Y., Qin J. (2003): MSH2 and ATR form a signaling module and regulate two branches of the damage response to DNA methylation. - *PNAS* 100 (26): 15387-15392.
- Warren J.J., Pohlhaus T.J., Changela A., Iyer R.R., Modrich P.L., Beese L.S. (2007): Structure of the Human MutS α DNA Lesion Recognition Complex. - *Molecular Cell* 26: 579-592.
- Whitfield M.L., Sherlock G., Saldanha A.J., Murray J.I., Ball C.A., Alexander K.E., Matese J.C., Perou C.M., Hurt M.M., Brown P.O., Botstein D. (2002): Identification of Genes Periodically Expressed in the Human Cell Cycle and Their Expression in Tumors. - *Molecular Biology of the Cell* 13: 1977-2000.
- Wieringa B., Hofer E., Weissmann C. (1984): A minimal intron length but no specific internal sequence is required for splicing the large rabbit beta-globin intron. - *Cell* 37 (3): 915-925.
- Will C.L., Lührmann R. (1997): Protein functions in pre-mRNA splicing. - *Current Opinion in Cell Biology* 9: 320-328.
- Wu J., Gu L., Wang H., Geacintov N.E., Li G.-M. (1999): Mismatch Repair Processing of Carcinogen-DNA Adducts Triggers Apoptosis. - *Molecular and Cellular Biology* 19 (12): 8292-8301.
- Wu X., Platt J.L., Cascalho M. (2003): Dimerization of MLH1 and PMS2 Limits Nuclear Localization of MutL α . - *Molecular and Cellular Biology* 23 (9): 3320-3328.
- Yang G., Scherer S.J., Shell S.S., Yang K., Kim M., Lipkin M., Kucherlapati R., Kolodner R.D., Edelmann W. (2004): Dominant effects of an Msh6 missense mutation on DNA repair and cancer susceptibility. - *Cancer Cell* 6 (2): 139-150.

Yoshino M., Nakatsu Y., te Riele H., Hirota S., Kitamura Y., Tanaka K. (2002): Additive roles of *XPA* and *MSH2* genes in UVB-induced skin tumorigenesis in mice. - DNA Repair 1: 935-940.

Yoshioka K.-I., Yoshioka Y., Hsieh P. (2006): ATR Kinase Activation Mediated by MutS α and MutL α in Response to Cytotoxic O⁶-Methylguanine Adducts. - Molecular Cell 22: 501-510.

Young L.C., Thulien K.J., Campbell M.R., Tron V.A., Andrew S.E. (2004): DNA mismatch repair proteins promote apoptosis and suppress tumorigenesis in response to UVB irradiation: an *in vivo* study. - Carcinogenesis 25 (10): 1821-1827.

Zhang H., Richards B., Wilson T., Lloyd M., Cranston A., Thorburn A., Fishel R., Meuth M. (1999): Apoptosis Induced by Overexpression of *hMSH2* or *hMLH1*. - Cancer Research 59: 3021-3027.

Zhang Y., Yuan F., Wu X., Rechkoblit O., Taylor J.-S., Geacintov N.E., Wang Z. (2000): Error-prone lesion bypass by human DNA polymerase η . - Nucleic Acids Research 28 (23): 4717-4724.

Danksagungen

Als erstes möchte ich Prof. Dr. Jürgen Wehland (Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (HZI), Braunschweig) meinen Dank aussprechen für die Bereitschaft, mein Mentor zu sein und die Aufgabe des Referenten zu übernehmen.

Bei Prof. Dr. Norbert Käufer (Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig) bedanke ich mich für die spontane Zusage zur Übernahme des Korreferats sowie für die sehr zeitintensiven, informativen und hilfreichen Gespräche.

Prof. Dr. Erko Stackebrandt (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweig) und Prof. Dr. Hans Drexler (DSMZ, Braunschweig) danke ich für den Arbeitsplatz, den sie mir zur Verfügung gestellt haben.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Willy Dirks (DSMZ, Braunschweig) für die gute Einarbeitung und Betreuung sowie die unermüdliche Diskussionsbereitschaft.

Dr. Christian Mielke (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) danke ich für die gute Zusammenarbeit und die Möglichkeit, das Laser Scanning Mikroskop an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf zu nutzen.

Bei Dr. Josef Wissing (HZI, Braunschweig) und Reiner Munder (HZI, Braunschweig) bedanke ich mich für die ausgezeichnete Einweisung in die Methode der 2D-Gelelektrophorese.

Für die tatkräftige Unterstützung vieler meiner Experimente und die gute Zusammenarbeit bedanke ich mich bei Silke Fähnrich (DSMZ, Braunschweig) und Yvonne Merkhoffer (DSMZ, Braunschweig). Margarete Zaborski (DSMZ, Braunschweig) danke ich für die Mithilfe bei den FACS Analysen.

Ein besonderes Dankeschön gilt allen meinen Kolleginnen und Kollegen, auf deren Hilfsbereitschaft ich mich stets verlassen konnte und die durch ihre gute Laune ein hervorragendes Arbeitsklima geschaffen haben.

In meinen Eltern und meinem Bruder hatte ich stets verständnisvolle Zuhörer, die mir mit manchem Rat zur Seite standen. Dafür danke ich ihnen ganz herzlich.

Schließlich möchte ich mich bei meinem Mann Jens bedanken, auf dessen Unterstützung ich jederzeit zählen konnte und der mich immer wieder zu motivieren wusste.

Lebenslauf

Annika Mareike Siebert, geb. Winter,
geboren am 26. Mai 1978 in Meppen.
Tochter von Dr. phil. Wolfgang Winter (Studiendirektor, Fachleiter an Studienseminaren)
und Gudrun Winter (Lehrerin an Grund- und Hauptschulen).
Verheiratet mit Jens Siebert (Diplombauingenieur).

Ausbildung

1984-1988	Paul-Gerhardt-Grundschule Meppen.
1988-1990	Anne-Frank-Schule Meppen (Orientierungsstufe).
1990-1997	Windthorst-Gymnasium Meppen.
1998-2004	Studium der Biologie, Universität Hannover. Schwerpunkte: Botanik, Geobotanik, Hydrobiologie.
2000	Vordiplom
2001-2002	Auslandsstudienjahr in Costa Rica im Rahmen des Integrierten Auslandsstudiums mit Stipendium des DAAD.
2003	Diplomprüfungen: Botanik (Evolution der Fortpflanzung, Standortanpassungen). Geobotanik (Moore, Nordseeküste, Mangroven). Hydrobiologie (Biologie der Abwasserreinigung, Limnoökologie).
2004	Diplomarbeit bei Prof. Dr. H.-J. Jacobsen am Lehrgebiet für Molekulargenetik, Universität Hannover: „Molekulare und funktionale Charakterisierung transgener Chrysanthemen“.
2005-2008	Promotion bei Prof. J. Wehland (Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig) unter Betreuung von Dr. W.G. Dirks an der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweig: „Herstellung und Evaluierung eines Modellsystems zur <i>in vivo</i> Untersuchung der humanen DNA Fehlpaarungsreparatur (<i>mismatch repair</i> - MMR)“.

Sonstige Aktivitäten

1997-1998	Pferdepflegerin/ Au-Pair in Andalusien, Spanien.
1999	Büro für Freiraumplanung in Meppen/ Versen. Erstellung und Auswertung botanischer und faunistischer Gutachten im Rahmen eines Praktikums.

- 1999-2001 BUND, Kreisgruppe Hannover.
Untersuchungen an städtischen Fledermauspopulationen und
Öffentlichkeitsarbeit zum Schutz von Fledermäusen als ehrenamtliche
Mitarbeiterin.
- 2003 Institut für Tierökologie und Zellbiologie, Tierärztliche Hochschule
Hannover. Hilfswissenschaftliche Tätigkeit im Bereich Studentenbetreuung.
- 2003-2004 Lehrgebiet für Molekulargenetik, Universität Hannover.
Hilfswissenschaftliche Tätigkeit im Bereich Studentenbetreuung und
Laborarbeiten.
- 2004 Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ),
Braunschweig.
Laborarbeiten im Rahmen eines Praktikums.

Sprachen

Englisch (fließend in Wort und Schrift),
Spanisch (fließend in Wort und Schrift),
Französisch (Schulkenntnisse).

PC-Kenntnisse

MS Office,
Photoshop,
ArcView.

Interessen

Dressurreiten (aktiv seit 1990),
Identifizierung und Systematik heimischer Pflanzenarten.